Biblioteca Digital
FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Análisis estructural y conformacional de E6*I, un producto de procesamiento alternativo derivado de la oncoproteína E6 de HPV16

Heer, Angeles

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Heer, Angeles. (2012). Análisis estructural y conformacional de E6*I, un producto de procesamiento alternativo derivado de la oncoproteína E6 de HPV16. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Heer, Angeles. "Análisis estructural y conformacional de E6*I, un producto de procesamiento alternativo derivado de la oncoproteína E6 de HPV16". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

“Análisis estructural y conformacional de E6*I, un producto de procesamiento alternativo derivado de la oncoproteína E6 de HPV16”.

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Angeles Heer

Director: Gonzalo de Prat Gay

Consejero de Estudios: Julio Javier Caramelo.

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, Fundación Instituto Leloir e IIBBA-CONICET, Buenos Aires Argentina.

Buenos Aires, 2012.

RESUMEN

Título: “Análisis estructural y conformacional de E6*I, un producto de procesamiento alternativo derivado de la oncoproteína E6 de HPV16”.

Las proteínas E6 de papilomavirus humano de alto riesgo participan en la progresión tumoral, mayoritariamente por su habilidad de promover la degradación de p53. Los transcriptos de HPV muestran un patrón de procesamiento complejo, donde E6*I es el transcripto más abundante en HPV de alto riesgo, correspondiendo en secuencia de aminoácidos a los primeros 50 aminoácidos de E6. Actualmente, no hay información estructural o bioquímica de este polipéptido que contiene la mitad del primer motivo de unión a Zn de E6, debido a la dificultad de obtener una estructura compacta y monomérica en tan pequeño polipéptido.

En este trabajo se muestra que E6*I de HPV16 puede plegarse en oligómeros con alto contenido de hélice-α o láminas-β a pH 7.5 y 5.0 respectivamente, en ausencia de Zn. Los oligómeros-β son altamente estables y no se ven afectados por la presencia de Zn, mientras que los oligómeros-α tienden rápidamente a agregar, evitando esto la presencia de Zn. Dos moléculas de E6*I unen una molécula de Zn, sugiriendo una coordinación tetraédrica de alta afinidad ($K_D < 10^{-12}$ M), que resulta en un dímero de E6*I mediado por Zn con significativa estructura secundaria.

Previamente se encontraron en el citosol de líneas celulares transformadas por HPV oligómeros endógenos de E6, y nosotros proponemos que las características determinantes de esta agregación se encuentran dentro de E6*I.

Los efectos reportados de E6*I están asociados a la regulación negativa de la proteína E6, y la relación entre ambas especies modula la degradación de p53 y otras cascadas de señalización de apoptosis. En este trabajo, demostramos la interacción directa y específica entre las proteínas E6 y E6*I de HPV16. La abundancia en la célula de E6*I con una naturaleza “camaleón” correlaciona con la plasticidad para unir blancos celulares, y su destino está asociado a un balance entre los niveles de proteína, la disponibilidad de Zn, el potencial redox y la oligomerización. Este pequeño pero complejo polipéptido está asociado a un efecto más que a una función de un producto viral que, cuando se encuentra en altas concentraciones, puede directa o indirectamente afectar varios procesos celulares.

Palabras claves: papilomavirus, E6, procesamiento alternativo, E6*I, proteínas de unión a Zn, cisteínas

Title: “Structural and conformational analysis of E6*I, an alternative splicing product derived from E6 HPV16 oncoprotein.”

ABSTRACT

High-risk human papillomavirus E6 participates in tumorigenic progression, mainly by its ability to promote p53 degradation. HPV transcripts show a complex splicing pattern, where E6*I is the most abundant transcript in high-risk HPV types, comprising the first 50 amino acids of E6. No structural or biochemical information of this polypeptide, which contains half of the first zinc binding motif of E6, is available, due to the difficulty to acquire a compact monomeric fold in such a small polypeptide. We show that HPV16-E6*I can fold into either a-helix or ß-sheet large oligomers at pH 7.5 and 5.0, respectively, in the absence of zinc. The ß-sheet oligomers are highly stable and unaffected by the presence of zinc, while the a-helix oligomers tend to rapidly form aggregates, prevented by the presence of the metal. Two E6*I molecules bind per atom of zinc, suggesting a tetrahedral, high affinity arrangement ($K_D < 10^{-12}$ M), which results in a zinc mediated E6* dimer with significant secondary structure. Endogenous E6 oligomers were previously found in the cytosol of high-risk HPV transformed cell lines, and we propose that the oligomerization determinant resides within E6*I. E6*I effects were reported to counteract those of E6 in cells, and the ratio between these two species modulates p53 degradation and other apoptosis dependent signaling cascades. In the present work, we show a direct and specific interaction between HPV16 E6 and E6*I. A residue of an evolved splicing event related to regulation of oncogene expression in HPV or a splicing event resulting from the selection of a small deleterious viral polypeptide, the abundant existence of E6*I with a “chameleon” nature correlates with target plasticity, and its fate is linked to a balance between protein levels, zinc availability, redox potential, and oligomerization. In addition, the results presented here have strong implications for zinc binding sites in nascent polypeptides. This evolved promiscuous folder speaks of effect rather than function of a viral product that, when highly increased, can directly or indirectly affect various cellular processes leading to cell deregulation and tumorigenesis.

Keywords: papillomavirus, E6, alternative splicing, E6*I, Zn binding proteins, cysteines

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL 11

HPV y el cáncer. 13

Bilogía molecular y ciclo de vida del papilomavirus. 15

Fundamentos de la transformación celular y cáncer. 19

La oncoproteína E7. 19

Estudios de E7 en solución. 20

La oncoproteína E6. 22

Estudios de E6 en solución. 25

Procesamiento alternativo en HPV. 28

E6*I. 31

CAPÍTULO I: PROPIEDADES CONFORMACIONALES DE E6*I 33

I.1. Condiciones de replegado de E6*I en solución. 39

I.2. Efecto de la fuerza iónica sobre E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$. 43

I.3 Análisis de las estructura cuaternaria de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$. 46

I.3.1. Morfología de los oligómeros obtenidos. *47*

I.3.2. Unión a Tioflavina T de los oligómeros de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$. *47*

I.4. E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 7.5}$ 48

I.4.1. Análisis de la estructura secundaria de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 7.5}$. *48*

I.4.2. Análisis de la estructura cuaternaria de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 7.5}$. *51*

I.5. Expresión recombinante de E6*I: evidencias de una secuencia “*leader*” de agregación 53

I.6. Discusión. 56

CAPÍTULO II: DISECCIÓN DE E6*I: ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LA PORCIÓN C-TERMINAL DE E6*I, E6*I_{29-53}. 61

II.1. Análisis de la estructura secundaria de E6*I_{29-53} en solución. 65

*II.1.1. Tendencias conformacionales de E6*I_{29-53} a pH 7.5.* *66*

II.2. Análisis de la estructura cuaternaria de E6*I_{29-53} en solución. 67

II.3. Estabilizadores de estructura secundaria. 69

II.3.1. Efecto del Trifluoroetanol sobre E6*I_{29-53}. *69*

II.3.2. Efecto del SDS sobre E6*I_{29-53} *73*

II.4. Estudio comparativo con tipos virales proteotípicas de HPV. 76

II.4.1. Estructura secundaria adoptada por los diferentes péptidos en solución. *78*

*II4.2. Efecto del TFE en E6*Ic de diferentes tipos de HPV.* *79*

*II.4.3. Efecto del SDS en E6*Ic de diferentes tipos de HPV* *81*

II.5. Discusión. 84

CAPÍTULO III: ROL DE LAS CISTEÍNAS EN EL COMPORTAMIENTO CONFORMACIONAL DE E6*I. 89

III.1. Análisis del estado redox de E6*I. 94

III.2. Identificación y caracterización de las especies oxidadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. 98

III.3. Determinación del potencial redox del puente disulfuro de E6*I. 102

III.4. Propiedades de unión a Zn. 103

III.5. E6*I C-terminal. 107

*III.5.1. Análisis del estado redox de E6*I_{29-53}.* *108*

*III.5.2. Propiedades de unión a Zn de E6*I_{29-53}.* *108*

III.6. Discusión. 113

CAPÍTULO IV: MECANISMO DE ACCIÓN DE E6*I Y

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS. 119

IV.1. Análisis de la interacción directa entre las proteínas E6 y E6*I 123

*IV.1.1. Interacción de E6 y E6*I analizada por gel (far western).* *123*

*IV.1.2. Interacción de E6 y E6*I_{29-53} analizada por far western.* *126*

IV.2. Generación de herramientas de detección. 130

IV.3. Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos. 132

IV.3.1. Reactividad analizada por ELISA indirecto. *133*

*IV.3.2. Reconocimiento de las proteínas E6 y E6*I en western blot.* *134*

IV.4. Discusión. 134

DISCUSIÓN GENERAL 139

PUBLICACIONES 147

MATERIALES Y MÉTODOS 149

Alineamiento de secuencias y análisis bioinformático. *151*

Materiales y preparación de la muestra *151*

Dicroísmo Circular (DC). *152*

Dispersión de Luz Dinámica (DLS). *153*

Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). *153*

Fluorescencia de Thioflavina T (ThT). *154*

Filtración en columnas de exclusión molecular (SEC). *154*

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida. *154*

*Clonado, expresión y purificación de E6*I y sus mutantes como proteínas de fusión.* *155*

Estabilización de estructura con Trifluoroetanol (TFE). *157*

Estabilización de estructura con Sodio Dodecil Sulfato (SDS). *158*

Cromatografía Líquida de Alta presión en Fase Reversa (RP-HPLC). *158*

Análisis de la reacción de oxidación por espectrometría

de masas MALDI-TOF. *159*

*Determinación del potencial redox de E6*I.* *160*

Experimentos de unión a Zn. *160*

Obtención de E6-HPV16 para producción de anticuerpos monoclonales. *162*

ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay) indirecto. *163*

Western Blot. *163*

*Marcación de E6*I con FITC.* *163*

Far Western. *164*

REFERENCIAS 167

INTRODUCCIÓN GENERAL

HPV Y EL CANCER.

La etiología infecciosa del cáncer asociado a papilomavirus (PV) se presumía desde fines del siglo XIX. Fue en los primeros estudios realizados por el físico Italiano Domenico Antonio Rigoni-Stern en 1843 donde, por primera vez, resultados estadísticos mostraron una correlación entre la incidencia del cáncer cervical y el comportamiento sexual de la población. Surgió así la idea de que el cáncer podía ser contagioso y que la actividad sexual representaba un factor de riesgo. Sin embargo, el estudio controversial de Rigoni y el principio de existencia de "un agente infeccioso" no fue asimilado hasta comienzos del siglo XX.

La existencia de agentes etiológicos de naturaleza viral fue propuesta en 1907 por Ciuffo, y en 1908 por Ellerman y Bang, utilizando filtrados de extractos libres de células capaces de originar verrugas precursoras de tumores (*1*). No obstante, como en la mayoría de los casos que involucran virus, estas sospechas fueron confirmadas recién en 1950 por microscopía electrónica (*2*) cuando finalmente se estableció al papilomavirus humano (HPV) como agente infeccioso de células epiteliales, causante a su vez, de diversas patologías que eventualmente pudieran dar origen a un proceso canceroso.

Hacia 1970 experimentos de zur Hausen por hibridizaciones semi-complementarias de ADNs provenientes de verrugas, demostraron la existencia de diversos tipos virales (*3, 4*). Los papilomavirus se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal; en la actualidad se han identificado más de 200 tipos virales diferentes (*5*) y clasificados en 16 grupos (*6*). Cada tipo de papilomavirus es específico para un huésped y la infección inter especie no se ha demostrado hasta el momento (*7*). Se distinguen dos grandes grupos: los virus cutáneos, que infectan y se replican en células epiteliales escamosas de la piel, tomando como ejemplo las verrugas comunes; y los virus mucosos que lo hacen en mucosas como conjuntiva oral, esofágica y genital. Los tipos que infectan mucosas presentan una alta especificidad de tejido y un sub-grupo de éstos está asociado a la transmisión sexual dando lugar, en muchos casos, a una lesión pre-cancerosa que en ausencia de tratamiento, puede conducir al desarrollo de cáncer de cuello de útero en mujeres y a otros tipos de cáncer. Se considera que la mayoría de la población sexualmente activa está o estuvo infectada con algún tipo de HPV. En la mayoría de los casos, la infección es asintomática y se resuelve espontáneamente; en otros casos, evoluciona en procesos cancerosos. No todos los tipos virales capaces de infectar el epitelio cervical representan el mismo riesgo de desarrollo de un carcinoma. Aquellos asociados a lesiones malignas se conocen como tipos de "alto riesgo" mientras

que los asociados a lesiones benignas se los conoce como tipos de “bajo riesgo”. Existen más de 35 tipos de HPV infectivos del tracto genital y sólo dos de esos tipos, específicamente 16 y 18, están asociados al 80% de los cánceres de cuello de útero relacionados a HPV. La incidencia de cáncer cervical relacionado al HPV no presenta una distribución mundial homogénea, siendo ésta más notable en países subdesarrollados (Figura A): esto está relacionado con la accesibilidad a información sobre profilaxis, un mejor control sanitario que posibilita la detección temprana y tratamientos adecuados para evitar el desarrollo tumoral.

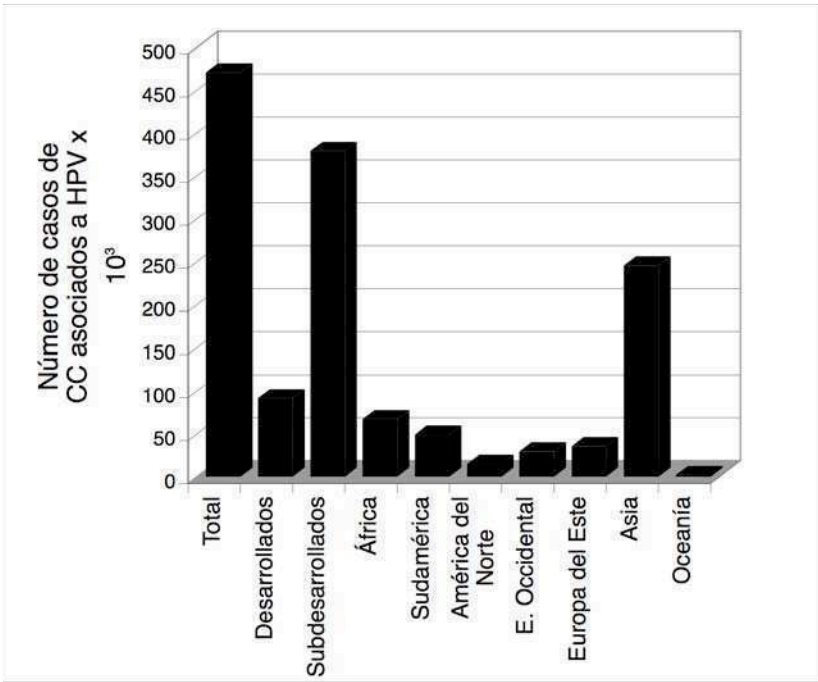


Figura A. Distribución mundial de los casos de CC relacionados a HPV. Localización regional de un total de 469.723 casos observados (Adaptado de Saverio Campo, 2006 (*8*)).

El virus se aloja exclusivamente en la piel y mucosas, no encontrándose ni en sangre ni en otros tejidos u órganos. El control sanitario que posibilita la detección temprana de anormalidades celulares en el epitelio cérvico-vaginal consiste en un estudio citológico por tinción con *Papanicolau*. Una vez detectadas alteraciones celulares en las células epiteliales, el diagnóstico de infección por papilomavirus de tipos de alto riesgo se realiza por las técnicas de hibridización *in situ (9-11)* o por PCR (*12*). Debido a la biología del virus, diagnosticar y prevenir el cáncer cervical por infección con HPV resulta dificultoso. Los sistemas de tipificación existentes son complejos, requieren de la extracción de muestras cervicales y de la detección del genoma viral en las mismas mediante la técnica de hibridización utilizando sondas marcadas radiactivamente.

Asimismo, no existen anticuerpos comerciales que posibiliten estudios de inmunohistoquímica sobre biopsias.

El potencial oncogénico asociado a estos virus impide la utilización de una vacuna profiláctica basada en viriones atenuados con margen de seguridad. Al principio de los años 90, diversos grupos describieron la capacidad que tenían las proteínas de la cápside viral, obtenidas de forma recombinante, de auto-ensamblarse formando partículas "tipo-virus"(*virus-like particles*, VLPs) (*13*). A partir de dicho descubrimiento, se realizaron ensayos de producción de vacunas basadas en VLPs capaces de generar respuesta en mucosas (*14*). Se desarrollaron las vacunas profilácticas Gardasil® (Merck) contra los tipos HPV6, 11, 16 y 18 y Cervarix® (GlaxoSmithKline) contra los tipos HPV16 y 18 (*15*) y se encuentran desde 2007 en el mercado, aunque su alto costo resulta inaccesible para la mayoría de la población en riesgo (*16*). En Argentina, aproximadamente 5000 mujeres son diagnosticadas cada año con cáncer cervical y 2000 mueren a causa de esta enfermedad (*17*). Actualmente, el tratamiento contra HPV fue incluido dentro del plan de vacunación nacional, siendo gratuita la vacunación para mujeres de 11 años de edad. Sin embargo, las vacunas existentes no protegen contra infecciones de otros tipos de alto o bajo riesgo, son profilácticas y su efectividad fue probada en un lapso de 5 años (*18, 19*). Por lo tanto continúa siendo necesario comprender el modo de acción y la oncogenicidad de los papilomavirus con el fin de desarrollar tanto estrategias profilácticas más eficientes y económicas como drogas antivirales terapéuticas.

BIOLOGIA MOLECULAR Y CICLO DE VIDA DEL PAPILOMAVIRUS.

La infección por papilomavirus (PV) requiere de una lesión o interrupción de la mucosa que permite la infección de las células basales, mitóticamente activas. Para este proceso, es necesario el contacto directo, sea éste sexual, cutáneo o de madre a hijo, donde células infectadas desprendidas de un individuo infectado conteniendo virus penetran en la lesión epidérmica del individuo no infectado. El virus ingresa en la célula a través de receptores aún no identificados; algunos investigadores han propuesto receptores de tipo integrina (*20*). El polisacárido heparina juega un papel importante en la adhesión del virus a la célula (*21*).

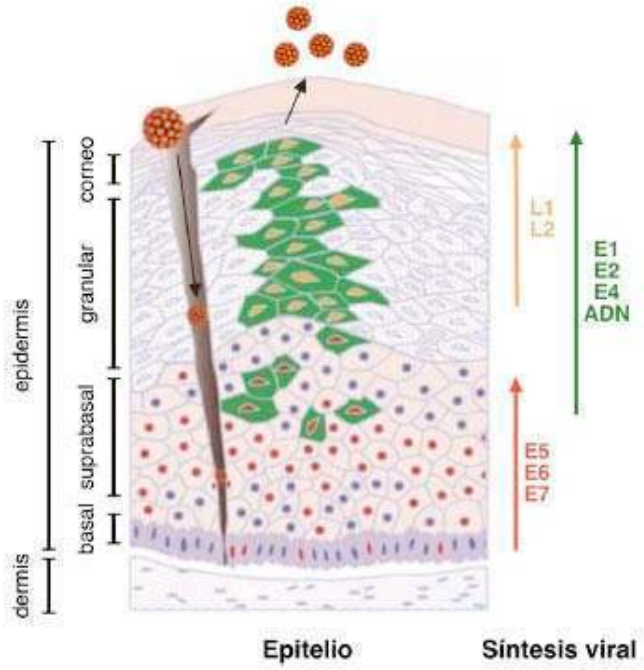


Figura B. Esquema de diferenciación celular y ciclo viral de los papilomavirus. Adaptado de Doorbar 2006 (*22*), Se muestra el patrón de expresión de las proteínas virales y de síntesis de ADN viral en los diferentes estratos de diferenciación epidérmica. A la derecha, en rojo la expresión de las proteínas E5, E6 y E7, en verde la expresión de las proteínas E4, E1 y E2 y la replicación del genoma viral y en naranja la expresión de las proteínas tardías L1 y L2, unidades formadoras de la cápside viral. A la izquierda se indican los diferentes estadios de diferenciación del epitelio.

El ciclo infeccioso del virus presenta un patrón de expresión de proteínas que depende del estadío de diferenciación del epitelio que es blanco de la infección viral (Figura B). Los primeros genes virales que se transcriben son los llamados tempranos (denominados con la letra E, del inglés *Early*); esto ocurre en la capa basal y se extiende hasta el estrato córneo en la superficie del epitelio (Figura B). En las capas intermedias (estrato espinoso o suprabasal) se produce la replicación vegetativa de ADN, y está bloqueada la producción de las proteínas de la cápside viral. A medida que avanza la diferenciación del epitelio cervical hacia la superficie, comienzan a expresarse, a partir de los genes tardíos (denominados con la letra L, del inglés *Late*), las proteínas L1 y L2 que conformarán la cápside viral. En la capa granular maduran los viriones, que se desprenderán del estrato córneo a medida que se descaman los queratinocitos terminales.

Los PV son virus pequeños sin envoltura de membrana y poseen una cápside icosahédrica de unos 50 nm, la cual alberga el genoma del virus. Su genoma es de ADN circular doble cadena y consta de aproximadamente 8000 pares de bases, con el

potencial de codificar de 8 a 10 productos proteicos (*23*).

Casi todos los genotipos de HPV poseen una organización génica semejante, con las funciones de control de transcripción y replicación ubicadas en la región de control río arriba (*Upstream Regulatory Region*, URR), la región de genes tempranos (E) que codifican para proteínas de replicación, control de transcripción y transformación celular; y la región de genes tardíos (L), que codifica para las proteínas de la cápside viral. La región URR contiene el origen de replicación, dos promotores, sitios de estimulación y represión de la transcripción y el sitio de poliadenilación tardía del ARN mensajero. Esta región está sujeta a una red de interacciones con la célula huésped que da lugar a la compleja relación entre el ciclo de vida del virus y la diferenciación de la célula hospedadora.

Todos los genes virales se transcriben a partir de la misma cadena de ADN y existen varios promotores activos en los diferentes estadíos de la infección y diferenciación celular (*24*).

Durante la mayor parte del ciclo de vida del virus, su genoma se mantiene como extra-cromosomal en estructuras semejantes a plásmidos llamadas episomas, manteniéndose un número moderado de copias, alrededor de 20, por célula. En determinado momento, y en paralelo con la iniciación de la transformación celular, el genoma viral se integra al genoma del huésped, interrumpiendo el marco de lectura de la proteína E2 y su acción regulatoria.

Los genes E1 y E2 codifican para proteínas que unen ADN y se expresan en células basales y parabasales del epitelio. E2 cumple roles regulatorios como factor de transcripción promoviendo la activación o reprimiendo la expresión de genes virales. Asimismo, tiene la capacidad de unirse a sitios de iniciación de la replicación y junto a E1, reclutan la maquinaria celular accesoria requerida para la duplicación del ADN del virus.

E1 se asocia como di-hexámeros que se unen a Hsp40 para formar dos anillos alrededor del ADN; éste complejo presenta actividad de helicasa y permanece unido al complejo de elongación mediante un proceso ATP-dependiente. Así, E1 constituye la única enzima codificada por el genoma viral descripta hasta la fecha, siendo la encargada de reclutar a la ADN polimerasa del huésped y a las proteínas de unión a ADN de cadena simple. A esto se suma la proteína viral E2, que junto a la polimerasa, constituyen la maquinaria replicativa viral. Este complejo es susceptible a fosforilación por el sistema ciclina E/cdk2 lo que le permite acoplarse al ciclo celular del huésped.

Por otra parte, los genes de expresión tardía, L1 y L2 son las proteínas que forman

la cápside viral. E2 también participa en el proceso de selección y empaquetamiento del DNA viral, uniéndose al mismo y formando complejos con L2 (*25*).

E4 se expresa como un componente tardío, si bien antes de la expresión de L1 y L2, con un rol poco claro en la infección viral productiva. Se ha reportado que la expresión de E4 no es esencial para la replicación ni la transformación celular. Se la describió como asociada al citoesqueleto y se propone que está asociada al colapso de la red de citoqueratina, pudiendo contribuir durante la replicación vegetativa del virus (*7*).

E5 no posee actividad enzimática descripta: su expresión se localiza asociada a membranas intracelulares y al aparato de Golgi. Se ha reportado que la expresión de E5 es capaz de transformar células de ratón en cultivo, estimulando el crecimiento celular. Como blancos celulares de interacción se identificaron al receptor de PDGF-β, el receptor de EFG, y la ATPasa vacuolar. Si bien su efecto oncogénico está en discusión, se acepta que E5 coopera con E6 y E7 en la estimulación de la proliferación celular (*7*).

E7 es una proteína pequeña de localización principalmente nuclear. Es capaz de inmortalizar líneas celulares en cultivo, tanto sola o en cooperación con el oncogen Ras o la proteína E6 de HPV. Se identificó que E7 utiliza como proteínas blanco al supresor de tumores retinoblastoma (Rb), así como otras llamadas *pocket proteins* que incluyen p107 y p130, y promueve su degradación, lo que genera la liberación del activador transcripcional E2F del complejo Rb-E2F y su activación. Esto permite la duplicación del ADN y la consiguiente división celular, manteniendo la célula en fase S (*26*). La función de E7 estaría regulada por múltiples modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación de varios residuos (*7*).

La proteína E6, como muchas proteínas virales que intervienen en el ciclo celular, puede formar complejos con el gen supresor de tumores p53. En células infectadas con HPV, los niveles de p53 son bajos, y se ha propuesto un mecanismo de degradación de p53 dependiente de ubiquitinación mediada por E6 y por la ubiquitina ligasa celular E6-AP. En trabajos recientes también se propone la degradación de p53 mediada por E6, independiente de la E3 ligasa E6AP (*27*). Entre otros efectos, la baja concentración celular de p53 bloquea la apoptosis de los queratinocitos y promueve la división celular favoreciendo una replicación viral prolongada. Son múltiples las cascadas de señalización donde interviene p53, quedando las mismas desreguladas en presencia de la oncoproteína E6 (*28*). Asimismo, E6 interviene en la degradación de una familia de proteínas que son responsables de dar características morfológicas a la célula, tales como la organización del citoesqueleto y la adherencia celular (*29*).

FUNDAMENTOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR Y CÁNCER

Las proteínas E6 y E7 fueron caracterizadas como los principales agentes responsables de la transformación celular por HPV, ya que son capaces de modificar el ciclo celular, en particular en células diferenciadas que no se encuentran en división, de manera tal de establecer un ambiente propicio para la replicación del genoma viral (*7*). Entre otras funciones, E6 desestabiliza p53 y previene la apoptosis, y E7 promueve la progresión en el ciclo celular mediante la degradación de la proteína Rb (*30*).

Las primeras evidencias que establecen una relación causal entre E6/E7 y la transformación celular provienen de la observación de varias líneas celulares tumorales: SiHa, CaSki, HeLa. Dichas líneas presentaban integrado en su genoma una o más copias del genoma de algún tipo de papilomavirus de alto riesgo. Esto resultaba en la consistente expresión de E6 y E7. En particular, fue demostrado que la sola expresión de E7 de tipos de alto riesgo es capaz de transformar líneas celulares de roedores, inmortalizar y transformar cultivos primarios de células de roedores (*31*) y finalmente, inmortalizar células epiteliales humanas (*32-34*). La combinación de E7 y E6, sin embargo, es altamente eficiente en transformar cualquier tipo de cultivo primario (*35, 36*), resaltando la cooperatividad de ambas proteínas para promover el cáncer.

De esta manera, E7 y E6 constituyen las principales proteínas oncogénicas virales modulando los procesos esenciales de transformación y malignicidad, respectivamente, que llevan al desarrollo tumoral.

El proceso por el cual el HPV facilita la iniciación y promueve la progresión del tumor, constituye un modelo excepcional para comprender el desarrollo de muchos otros cánceres humanos y también permite identificar vías de señalización adicionales afectadas en la progresión maligna. La importancia dada a comprender la contribución de la infección por HPV en la progresión maligna se ve resaltada por el otorgamiento del Premio Nobel en el año 2008 a Harold zur Hausen por su descubrimiento respecto de que los tipos virales de alto riesgo de HPV son los agentes causantes de cáncer de cuello de útero (*37*).

LA ONCOPROTEÍNA E7

La proteína E7 es un polipéptido pequeño de aproximadamente 100 aminoácidos que es capaz de unirse a múltiples blancos celulares y virales (*37-40*). Si bien el blanco principal de E7 es Rb, la lista de blancos celulares alternativos es muy extensa

desconociéndose en muchos casos, la consecuencia funcional de dichas interacciones (ver tabla I). Tampoco existe hasta el momento consenso sobre cuál o cuáles de los blancos celulares con los que E7 interactúa son responsables de las múltiples funciones biológicas con que se relaciona a la proteína y el número de blancos es asombrosamente grande para una proteína tan pequeña compuesta sólo por 98 aminoácidos. Ninguna de las interacciones puede explicar por sí sola el fenotipo celular que produce la transformación con E7.

Tabla I. **Algunos de los blancos celulares de E7 HPV16.**

Blanco celular	Consecuencias
pRB, p107, p130	Disrupción del complejo con E2F, degradación
p21	Inactivación de la actividad kinasa
p27	Inactivación de la actividad inhibidora de kinasa
TBP	Desconocida
TAF-110	Desconocida
AP-1	Activación de la función activadora de c-jun
Mi2β (HDAC)	Desconocida
IGFBP-3	Inhibidora de apoptosis mediada por IGFBP-3
M2 piruvato kinasa	Desconocida
α-Glucosidasa	Desconocida
hTid-1	Desconocida
p48 componente de ISGF3	Inhibición de la estimulación por interferon-α
F-actina	Desconocida
MPP2	Activación de la actividad transcripcional de MPP2
subunidad S4 del proteosoma	Desconocida

ESTUDIOS DE E7 EN SOLUCIÓN

E7 consiste de dos dominios estructurales, un dominio N-terminal nativamente desplegado (E7N) (*41*), y un dominio C-terminal globular con una topología β1β2α1β3α2 que media la homo-dimerización y une un átomo de Zn por monómero de E7 (E7C) (*42*-

45) (Figura C). E7N contiene las regiones conservadas CR1 y CR2, quienes median la interacción con múltiples proteínas celulares y virales (*46*).

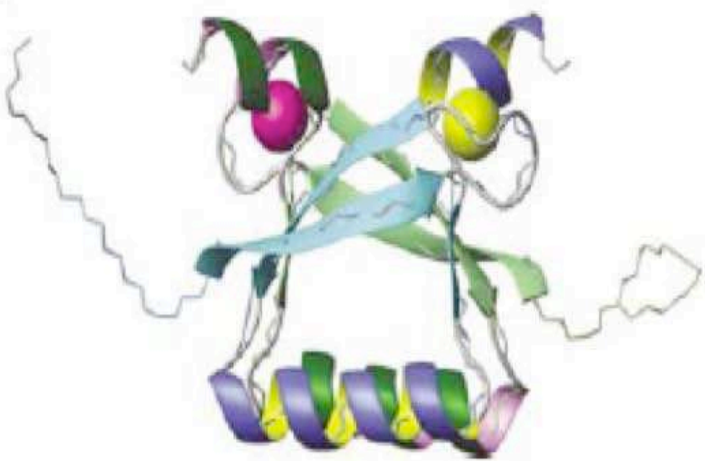


Figura C. Estructura de E7 HPV16. Adaptado de Ohlenschlager et al, 2006 (*44*).

Estudios de nuestro grupo sobre la conformación en solución de la proteína E7 HPV16 muestran que el dímero puede sufrir múltiples transiciones conformacionales que incluyen un equilibrio con un monómero plegado (*42*) (Figura D).

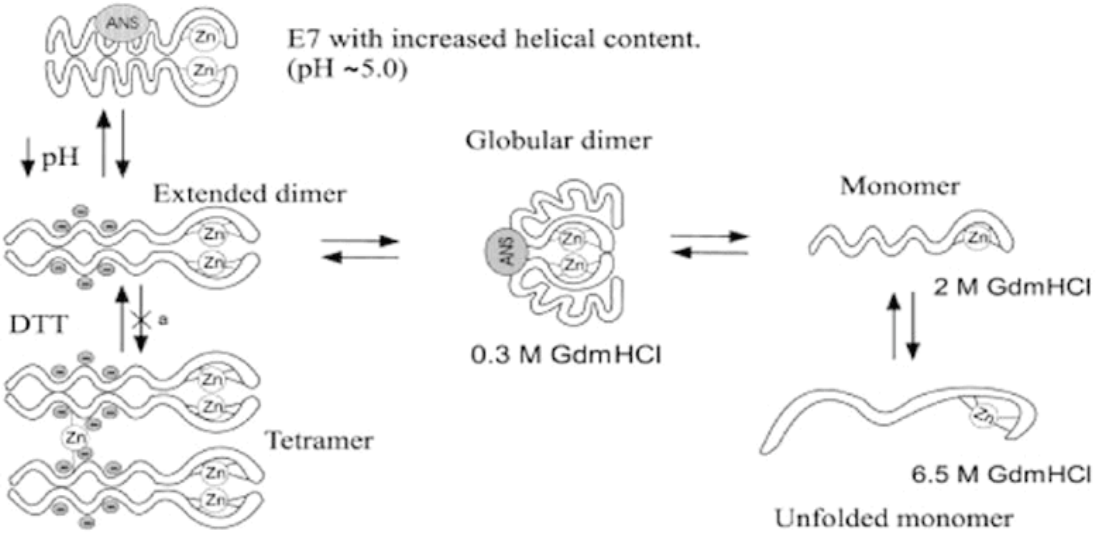


Figura D. Equilibrios conformacionales de E7 HPV16. Tomado de Alonso et al, 2002 (*42*).

Tanto E7 como el dominio E7N fueron clasificados como una proteína o dominio intrínsecamente desordenado o "IDP"; el análisis biofísico de este dominio en solución muestra una flexibilidad conformacional en diversas regiones y una conservación de secuencia tan alta como la hallada en dominios globulares (*41*). Esta propiedad "IDP" diferencia al dominio E7N de una conformación "desordenada", e implica que su

secuencia evolucionó para adquirir una estructura extendida y dinámica en solución, contribuyendo a la funcionalidad de la proteína y permitiendo explicar la capacidad de unión de un alto número de blancos por una proteína pequeña (*42*). Dependiendo de las condiciones químicas del medio y del estado de fosforilación, E7N presenta diferentes equilibrios dinámicos entre una conformación desordenada y estructura secundaria de tipo hélice alfa y poliprolina tipo II (*41*).

Además, nuestro grupo y otros, también demostraron que E7 es capaz de formar oligómeros solubles *in vitro* (*47, 48*) e *in vivo* (*49*). Estos oligómeros solubles, denominados E7SOs, se obtienen *in vitro* al remover el Zn unido al dominio C-terminal; son esféricos, tienen alto contenido de estructura secundaria tipo lámina-β y unen tioflavina T. Estas estructuras poseen actividad chaperona sobre sustratos modelo, sugiriendo que E7 podría actuar como una chaperona *in vivo* (*50*). La gran plasticidad conformacional de E7 indica que ésta proteína ha evolucionado para la unión por un pequeño dominio a múltiples blancos celulares (*51-54*).

LA ONCOPROTEÍNA E6

E6 posee un marco de lectura abierto cuyo promotor principal ocupa la región que comprende los pares de bases entre las posiciones 97-105. El mismo produce un ARN mensajero policistrónico que codifica para el polipéptido completo, formas truncadas (E6*) o especies quiméricas que incluyen regiones codificantes para E7, E1 y E2 (*55, 56*).

La proteína E6, en su versión completa, está codificada por alrededor de 150 aminoácidos. Existe entre un 50 y 60% de similitud entre las E6 pertenecientes a tipos de alto y bajo riesgo, y todas presentan 4 motivos CxxC que involucran la unión de Zn (*57*). Debido a la presencia de estos dos motivos CxxC casi simétricos, y a la presencia de uno de ellos en la oncoproteína E7 se postula que el origen de ambas proteínas sería único y producto de una duplicación génica de la región de E7 CR3 seguida de divergencia (*58*).

Como se describió anteriormente, la denominación de E6 como “oncoproteína” se debe principalmente a su actividad degradativa sobre p53. El rol crucial del supresor tumoral en la regulación del ciclo celular y vías apoptóticas ha sido ampliamente descripto, ya que la mutación deletérea en su locus resulta en la alteración genética más frecuente de todos los cánceres humanos (*59*). Se sabe que el nivel intracelular de p53 está disminuido en células transformadas por HPV (*60*) y que el tiempo de vida media pasa de ser de 1-2 horas en queratinocitos normales, a ser de 15-30 minutos en queratinocitos inmortalizados por tipos de alto riesgo de HPV (*60*). Paralelamente se ha

demostrado que E6 promueve la degradación de p53 *in vitro* vía el sistema ubiquitinación-proteasoma (*61*) y que la capacidad de unir p53 por E6 está mediada por la interacción con una tercera proteína con función de ubiquitina-ligasa, E6-AP (*62*). Si bien p53 es el blanco más estudiado de E6, se postularon diversos mecanismos oncogénicos alternativos e independientes de dicho supresor tumoral que podrían ser tanto o más relevantes en la vía de transformación celular mediada por E6 (*29*). Lo aquí postulado se basa en las siguientes observaciones: la existencia de líneas celulares transformadas con HPV que presentan niveles normales de p53 con una respuesta normal frente al daño del ADN (*63*) y que la entrada de la célula en apoptosis puede ser independiente de p53 (*64*).

Como ocurre con la oncoproteína E7, existen múltiples blancos descriptos para E6 y estos pueden ser clasificados en cuatro grupos principales: I) factores de transcripción, co-activadores y transductores de señales, II) proteínas pro-apoptóticas, III) proteínas involucradas en la arquitectura celular, mediadoras de la polaridad y la adhesión celular y, IV) factores de replicación y reparación del ADN (*11*). En la Figura E se presenta un resumen de las interacciones de la oncoproteína E6 con otras proteínas y las vías sobre las que incide (*65*).

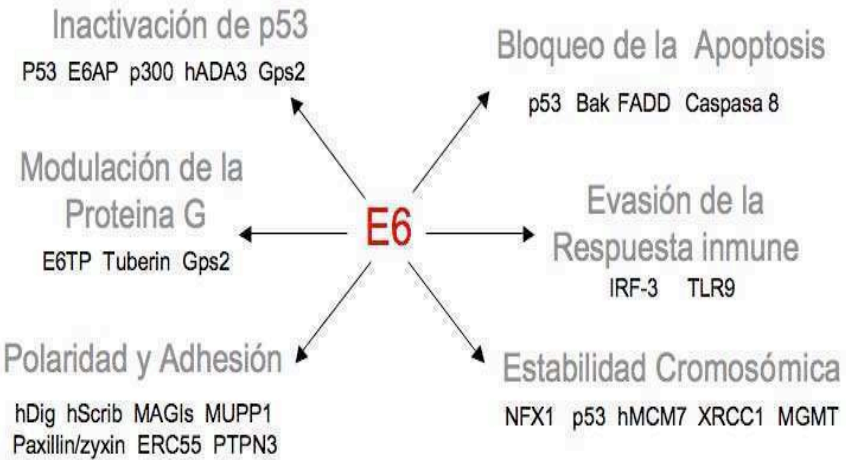


Figura x. **Blancos de interacción de la oncoproteína E6.** E6 interviene en numerosos procesos celulares a través de la unión a otras proteínas. Adaptado de Howie et al (*65*).

Adicionalmente, la proteína E6 de tipos de HPV de alto riesgo posee en su extremo C-terminal el motivo “ETQV” de unión a proteínas que contienen dominios PDZ (*66*). Es así como las proteínas E6 de los tipos de alto riesgo, pero no los de bajo riesgo, interactúan con miembros de la familia MAGI, proteínas que se cree actúan o interactúan como supresores tumorales; y con numerosas proteínas relacionadas con la adherencia, la arquitectura y la polaridad celular. Las proteínas hDlg, la hScrib, y MUPP controlan la

polaridad celular, y su interacción con E6 puede conducir a la desregulación de la organización del citoesqueleto y de interacciones célula-célula. Se ha demostrado que E6 promueve la degradación de estas proteínas vía el proteasoma 26S (*67*).

Si bien existen numerosos estudios funcionales y celulares sobre la proteína E6, y el número de blancos celulares con los que interactúa se incrementa día a día, surgen muchos interrogantes acerca de su localización celular y de los niveles de expresión de la misma en tejidos transformados. Actualmente no existen buenos anticuerpos comerciales anti-HPV E6, debido probablemente a la dificultad de obtener la proteína recombinante, y no se conoce la localización de la proteína endógena en células o en tejidos infectados y transformados por HPV. Sin embargo y a pesar de carecer de las herramientas adecuadas para su detección, E6 es considerada como una proteína que se encuentra en bajos niveles en la célula (*68*). En bibliografía se encuentran resultados contradictorios acerca de la distribución de la oncoproteína E6 y en todos los casos se trabaja con proteína transfectada y consecuentemente con niveles supra-fisiológicos. Está reportado que ésta se distribuye en la zona perinuclear citoplasmática (*69*), que presenta co-localización citoplasmática con p53 (*70*), en el núcleo y en la región perinuclear (*68, 69, 71*) y que manifiesta una distribución homogénea en núcleo y citoplasma (*72*). Por otra parte se determinó que E6 puede ser translocada al núcleo y esto ocurriría a través de una señal que presenta la oncoproteína en su dominio C-terminal (*73*); además posee tres señales de localización celular (NLS) que contribuyen a la acumulación de la proteína en el núcleo (*74*). Todos estos resultados son dependientes de la línea celular utilizada para realizar la transfección y de la proteína clonada como fusión a E6.

En el laboratorio se desarrollaron sueros policlonales de alto título anti-E6 de las cepas HPV16 y 18 y fueron utilizados en ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (*75*). Los sueros reconocieron a la proteína E6 endógena tanto en las líneas celulares CaSki y HeLa, naturalmente transformadas por HPV, como en muestras de biopsias de cáncer de cuello de útero relacionadas al HPV. Las imágenes de inmunofluorescencia mostraron que las E6 de los tipos HPV16 y 18 se encuentran uniformemente distribuidas en la célula (núcleo y citoplasma) (*75*). Los anticuerpos también permitieron detectar a E6 en muestras de biopsias de adenocarcinoma que presentan una co-infección para HPV16 y 18, previamente determinado por PCR.

ESTUDIOS DE E6 EN SOLUCIÓN.

Se describe en la literatura que resulta dificultosa la producción de proteína E6 recombinante principalmente por obtenerse proteína mal plegada en forma de agregados insolubles (*76*), debido a la presencia de numerosas cisteínas en su secuencia (*76, 77*). Distintos autores reportan la obtención de muestras monodispersas con agregados insolubles y describen estrategias poco eficientes para obtener proteína soluble. Algunas de estas estrategias consisten en la utilización de agentes quelantes (*78*), reductores o la fusión a dominios globulares como GST y MBP (*77*). En estos trabajos se asume que la oncoproteína E6 funcional sería monomérica, no obstante esto no se ha comprobado fehacientemente.

En un estudio, se logró producir proteína HPV16 E6 recombinante mutando 6 residuos cisteína, aparentemente no conservados, por serinas, a fin de minimizar problemas de oxidación (*77*). Con esta mutante se realizaron ensayos funcionales de degradación de p53 *in vitro*, concluyendo que esas cisteínas no eran fundamentales para la actividad de la oncoproteína (*79*).

En la actualidad no hay información estructural de la oncoproteína salvaje y completa. Esta proteína está compuesta por dos dominios de unión a Zn correspondientes a los residuos 7-83 y 87-153 (E6N y E6C, respectivamente), conectados por un espaciador de 4 residuos (residuos 83-86) y flanqueados por un *loop* N-terminal (residuos 1-6) y un *loop* C-terminal (residuos 54-158) (*80*). Existen sólo dos estudios donde caracterizan el dominio N-terminal (*81, 82*) y recientemente se resolvió la estructura del dominio C-terminal (*80, 83*). La Figura F muestra la estructura del dominio C-terminal de E6 HPV16; la misma se obtuvo por RMN y a partir de sustituir 4 residuos cisteína por serinas, que según los autores, no se encuentran conservados. Dicho dominio constituye un nuevo motivo de plegamiento que une Zn en forma externa y expone parches, superficies hidrofóbicas, al solvente.

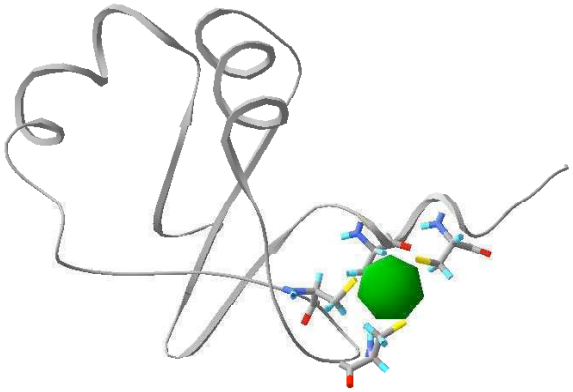


Figura F. **Estructura del dominio C-terminal de HPV16 E6 (C4S) en solución.** PDB: 2FK4 (*80*). En verde se representa un átomo de Zn unido por 4 cisteínas en las posiciones 103, 106, 136 y 139.

En nuestro laboratorio se demostró que las proteínas E6 pertenecientes a las dos tipos de alto riesgo presentes en el 80% de lo CC pueden plegarse espontáneamente a estructuras oligoméricas esféricas (E6SOs) de 22 a 25 nm de diámetro que resultaron ser muy estables a la desnaturalización térmica. Ambos oligómeros presentan un alto porcentaje de hélice-α en su estructura, a juzgar por sus espectros de DC en el UV lejano (*75*), lo que fue confirmado a partir de la estructura del dominio C-terminal de HPV16 E6 (Figura F).

Además se describió la obtención de una proteína monomérica con características de un glóbulo fundido que expone superficies hidrofóbicas y cargadas (sensible al pH y a la concentración de NaCl), inestable como monómero en solución y con alta predisposición hacia la oligomerización. El alto grado en la tendencia hacia la oligomerización observado, podría estar indicando que la existencia de E6 como monómero aislado en la célula determine su alta tasa de recambio y que sea posible la formación de complejos homo u hetero oligoméricos intracelulares. Por último, se postuló un modelo (Figura G) compatible con las observaciones estructurales y funcionales realizadas en el laboratorio:

Una vez sintetizada, E6 podría seguir diferentes caminos: plegarse como monómero y ser translocado al núcleo donde participaría en la degradación de p53. Asimismo, puede permanecer en el citoplasma formando especies oligoméricas; estos oligómeros pueden estar constituidos solamente por proteína E6 o bien integrar hetero-oligoméros con otras proteínas como las PDZ, o algunos de los diversos blancos descriptos. Finalmente, los E6SOs podrían existir en el citosol como reserva de oncoproteína cuando su concentración excede la capacidad de interacción o la translocación nuclear, y el equilibrio monómero-oligómero podría estar mediado por algún

mecanismo redox.

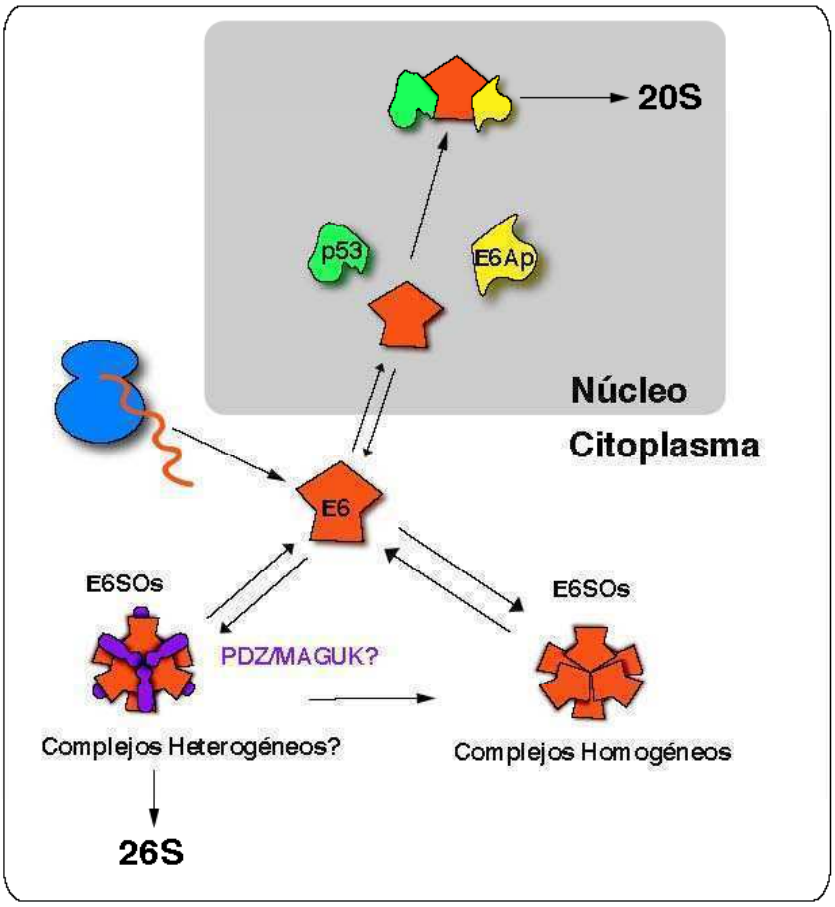


Figura G. Esquema del modelo propuesto para la localización de los confórmeros de E6 en la célula. (Figura adaptada de Garcia-Alai MM (*75*)). En naranja se representa a la oncoproteína E6, la misma puede existir como monómero u oligómero. Las formas oligoméricas se encuentran en el citosol y pueden estar formadas solo por E6 o por la misma asociada a otras proteínas como las denominadas PDZ. Por su parte el monómero es translocado al núcleo donde presenta su actividad anti p53 y es degradada por el proteasoma.

Trabajos posteriores confirmaron la tendencia oligomérica de E6; mostraron que proteínas E6 de diferentes tipos humanos y bovinos se auto-asocian tanto *in vitro* como *in vivo* (*84*). Estos grupos sugieren que la conservación de este mecanismo dentro de la familia de proteínas E6 indica que el proceso posee un rol funcional. Una hipótesis interesante para el papel funcional de estos oligómeros de E6 podría ser la unión simultánea de múltiples proteínas celulares, resultando en la coordinación de varias vías de interacción virus-huésped. De este modo, se incrementaría la eficiencia de las proteínas E6 y por consiguiente su potencial oncogénico.

PROCESAMIENTO ALTERNATIVO EN HPV.

La transcripción génica de HPV es controlada por dos promotores principales, el promotor temprano p97 y el tardío p670 (*85*). La activación de ambos promotores se encuentra regulada por la diferenciación del epitelio infectado por el virus, que resulta en la síntesis de mRNA policistrónicos, los cuales son aún más regulados por procesamiento alternativo (*86, 87*). El procesamiento alternativo es considerado una de las fuentes más importantes de generación de diversidad funcional y su uso es importante para la expresión equilibrada de múltiples reguladores virales a partir de un ARN policistrónico. Este mecanismo de incremento del repertorio génico junto con otros procesos como el solapamiento de genes, se ven muy representados en virus contribuyendo con su economía genómica.

La transcripción de la mayoría de los genes de HPV en el contexto del genoma entero, ya sea en las etapas tempranas o tardías del ciclo de vida del virus, conduce a una variedad de combinaciones de productos de procesamiento alternativo y quimeras, en muchos casos, con funciones desconocidas (Figura H). Sin embargo, es difícil detectar niveles de proteína en los estadios tempranos de la infección. Además, los patrones de procesamiento alternativo varían ampliamente con la línea celular, tanto en células transfectadas como transformadas naturalmente (*56, 85, 88-90*).

Las formas procesadas, denominadas E6*I, son las especies más abundantes en tumores cervicales y líneas celulares naturalmente transformadas por HPV y estarían presentes sólo en tipos de alto riesgo, no en los de bajo riesgo como HPV6 y 11 debido a la ausencia del sitio consenso necesario para que ocurra la edición del ARN (*91, 92*). Este procesamiento interrumpe el marco de lectura abierto (ORF) de E6 sin modificar el marco de E7, por lo que la oncoproteína E6 no se expresa más. E6*I del tipo viral HPV18 se detectó por inmunoprecipitación en ratones infectados con la línea celular HeLa (*93*). Los posteriores intentos de identificar la proteína endógena fueron infructuosos; posibles explicaciones de este hecho son bajas concentraciones celulares de E6*I, estando por debajo del límite de detección de las técnicas existentes actualmente, o un enmascaramiento de epitopes por interacción con otras proteínas (*94*).

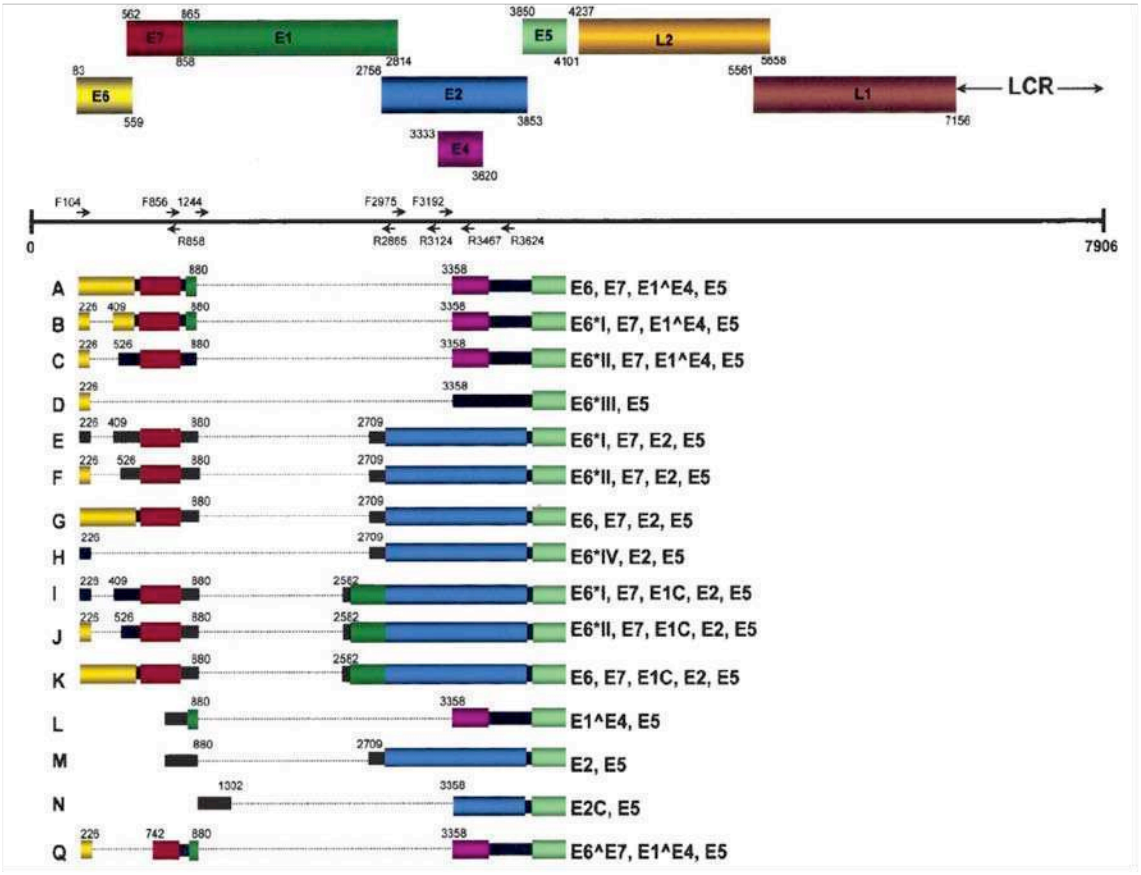


Figura H. Mapa genómico y representación de los ARN mensajeros aislados en muestras infectadas por HPV16. Los mensajeros son productos de procesamiento alternativo de los transcriptos codificantes para los genes E. Las cajas coloreadas en la región superior del esquema corresponden a los marcos de lectura abiertos de los productos génicos del HPV16. En la parte inferior se indican qué exones figuran en los mensajeros aislados de muestras de pacientes con carcinoma cervical. Figura extraída de Ordoñez et al. (*56*).

Inicialmente se consideró que este procesamiento del ARN incrementaba la eficiencia de traducción de E7, por aumentar el espacio intercistrónico entre ambos ORF y permitiendo a toda la maquinaria de traducción ubicarse con mayor facilidad (*95*). Posteriormente, se empezaron a atribuir efectos como proteína a estos productos generados por procesamiento alternativo. Se demostró que E6*I de HPV18 tiene la capacidad de unirse a la proteína E6 y evitar la degradación vía proteasoma de p53, incrementando la transcripción mediada por este supresor de tumores y el arresto celular en células que expresan E6 (*96, 97*). Esta primera evidencia de un rol regulatorio de E6*I ocurre de manera dependiente del ciclo celular, donde E6 se mantiene constante a lo largo de todas las etapas del ciclo mientras que E6*I varía, siendo en las fases G2/M donde hay mayor concentración (*98*). Sin embargo, observaron que la inhibición de la

degradación de p53 mediada por E6 no siempre es suficiente para activar vías apoptoticas mediadas por p53 en líneas HPV-positivas (*99*). Estudios más recientes que muestran que la proteína E6 HPV16 puede inhibir la vía de muerte celular programada disparada por factores extrínsecos al interactuar con el receptor TNF1, FADD y procaspasa 8, sugieren fuertemente otros medios por los cuales la inhibición por parte de E6*I de las funciones de E6 pueden llevar a la apoptosis (*94, 100, 101*).

En este sentido, se demostró que E6*I HPV16 une y estabiliza a la proteína Procaspasa 8. Esta proteína es enviada a degradación vía proteasoma por la proteína E6, modificando entonces la respuesta celular a citoquinas de la familia de TNF y finalmente inhibiendo a la célula de entrar en apoptosis (*94*); este mecanismo de evasión de la respuesta inmune es una estrategia común a muchos virus (*102*). Aunque ambas proteínas unen procaspasa 8, E6 acelera la degradación mientras que E6*I la estabiliza. Nuevamente, la acción de E6*I se opone a la de E6, sugiriendo fuertemente que tanto en virus como en eucariotas, las variantes de procesamiento alternativo pueden tener efectos biológicos opuestos. Además, demostraron que tanto el nivel de expresión como la relación entre las proteínas E6/E6*I son factores importantes en la modificación de las vías de apoptosis disparadas por factores externos que involucran a la proteína Procaspasa 8 (*103*). Aunque fueron capaces de detectar E6*I en células tranfectadas transientemente, el protocolo de inmunodetección utilizado carece de suficiente sensibilidad para detectar la versión pequeña de E6 en líneas celulares transfectadas establemente. El grupo sugiere que esto es posible, en parte, por la inestabilidad de la proteína. Otra razón probable es la tendencia de E6*I a formar complejos con ella misma, con E6 o con otras proteínas virales, de manera tal que los epitopes a los que se unen los anticuerpos se encuentren menos disponibles.

Además, se identificaron nuevos efectos de E6*I independientes de la proteína E6: E6*I interactúa e induce la degradación de la proteína PATJ (*65*) y también induce la degradación, aunque en este caso no hay interacción directa, de las proteínas Akt y Dlg (*104*). Estos resultados son sorprendentes, considerando que estas proteínas pertenecen a la familia de las proteínas PDZ y la interacción ocurre través de motivos PDZ que se encuentran en el extremo C-terminal de E6 y ausentes en E6*I. Estos grupos sugieren que E6*I puede afectar las proteínas celulares cuya localización resulte inaccesible para la proteína E6 entera; de este modo, E6*I actuaría de manera sinérgica con la oncoproteína E6. E6*I también puede inhibir o mejorar algunas de las funciones de E6 entera, interactuando directamente con ella y permitiendo así la posibilidad de funciones

aún no identificadas para los hetero-oligómeros formados por las interacciones entre estas dos proteínas (*104*).

La Figura I muestra un modelo propuesto en la literatura para la regulación de E6 mediada por E6*I, donde los ejemplos presentados en esta introducción podrían tener lugar.

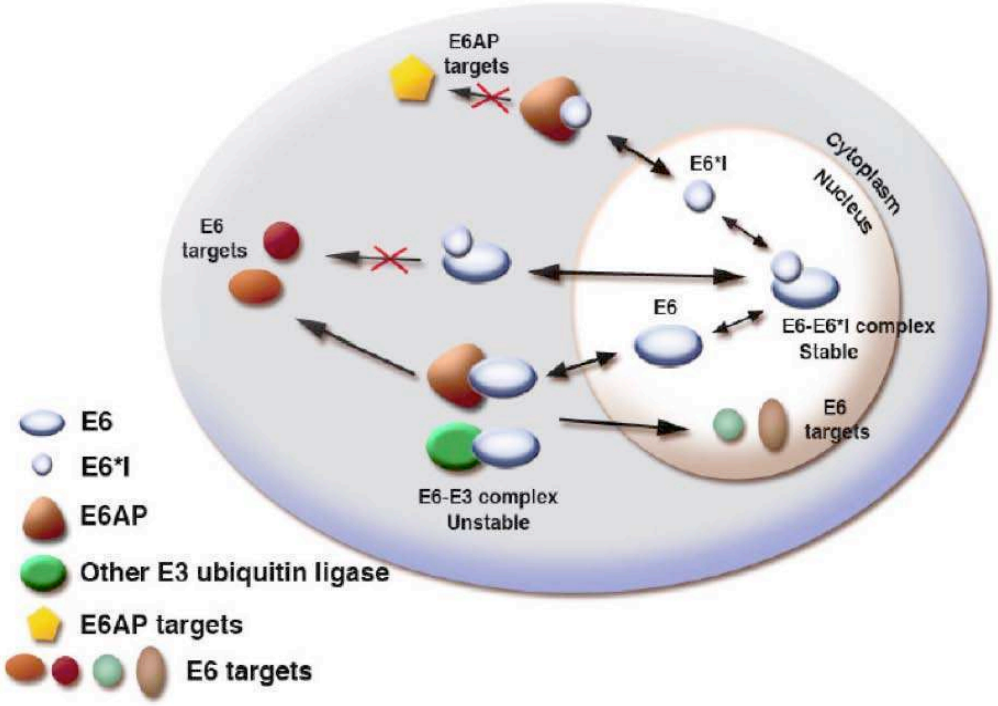


Figura I. Esquema del modelo propuesto para la regulación de E6 mediada por E6*I. (Figura tomada de Vaeteewoottacharn K (*105*)). La formación de complejos E6-E6*I evita la interacción de E6 con sus blancos celulares y la consiguiente degradación de los mismos. E6*I también podría interactuar con otros blancos celulares imposibilitando la interacción con E6..

Este esquema presenta a la interacción entre las dos proteínas como una modalidad de regulación negativa de E6 mediada por E6*I. Por otro lado, la interacción directa de E6*I con otros blancos celulares como la E3 ligasa E6AP sería otra forma de evitar la degradación de proteínas celulares mediadas por E6.

E6*I.

Como se describió previamente, el procesamiento alternativo que da origen al mensajero E6*I genera un corrimiento del marco de lectura abierto de E6 y la aparición de un codón de terminación prematuro, impidiendo que se exprese la proteína E6 entera. El polipéptido que se traduce de este transcripto procesado posee los primeros 50

aminoácidos de la secuencia de la proteína E6 entera. En la Figura J se indican, sobre la secuencia de la proteína E6 de HPV16, el sitio de procesamiento y en sombreado los aminoácidos que corresponden a la secuencia primaria de E6*I. Como se observa en este esquema, E6*I posee sólo la mitad de un motivo de unión a Zn, interrumpiendo un dominio independiente de plegamiento en E6. Actualmente, no existe una estructura del dominio N-terminal de E6 que permita analizar qué elementos de estructura secundaria de la proteína nativa son interrumpidos por el evento de procesamiento alternativo aunque la ausencia de la mitad de un motivo de unión a Zn indica que la estructura de E6*I debe ser distinta de la adoptada por la proteína E6.

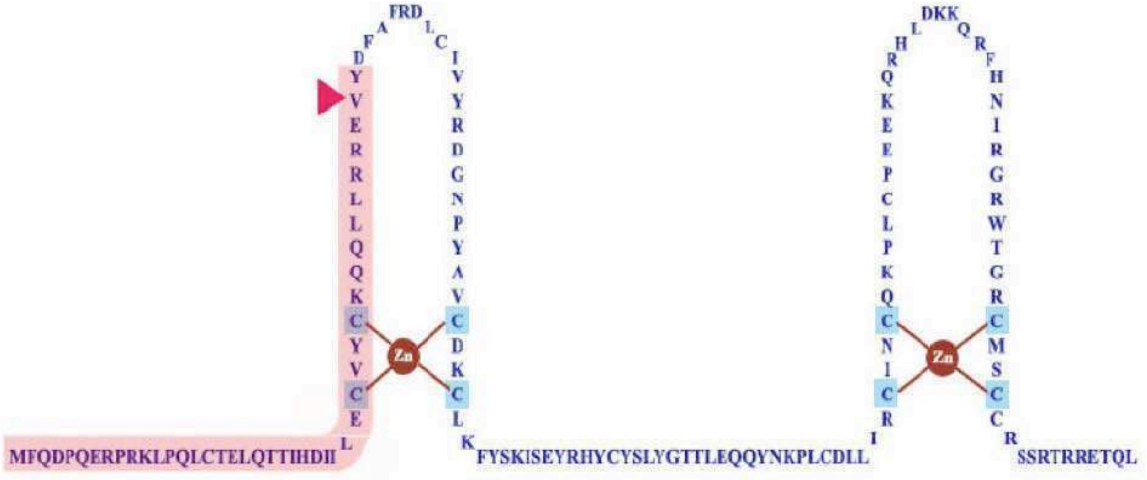


Figura J. Secuencia de las proteínas E6 y E6*I. (Figura tomada de Vaeteewoottacharn K (*105*)). Se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína E6 de HPV16 (considerando 151 aminoácidos), indicando las cisteínas estrictamente conservadas involucradas en la coordinación del metal en cada uno de los dominios *Zn finger* de esta proteína. Con una flecha se indica el sitio de procesamiento alternativo que da origen a E6*I y en rosa la secuencia primaria de E6*I donde se observa que conserva sólo dos cisteínas de este motivo de unión a Zn.

Son muchos los trabajos que muestran un efecto de E6*I como proteína en la célula, pero hasta el momento no existe información estructural de este producto de procesamiento alternativo. El objetivo de esta tesis consiste en la obtención de información a este nivel, que permitirá aportar a la comprensión del funcionamiento de E6*I en el contexto del ciclo de vida del virus y del proceso de transformación celular inducido por las oncoproteínas E6 y E7.

CAPÍTULO I:

Propiedades conformacionales de E6*I

Como se describió en la introducción, las oncoproteínas E6 y E7 de HPV son traducidas a partir de un mensajero bicistrónico o policistrónico, que en el caso de tipos de alto de riesgo posee múltiples sitios de procesamiento alternativo los que, a su vez, pueden dar origen a nuevos polipéptidos.

El transcripto E6*I, generado por procesamiento alternativo, es el mensajero más abundante en tumores cervicales y líneas transformadas por HPV (*91, 92*). Este mensajero genera un sitio de terminación prematuro que evita la traducción de la proteína E6 entera. Inicialmente se propuso que estos eventos de procesamiento del ARN aumentaban la eficiencia de traducción de E7 por aumentar el espacio intercistrónico (*95, 106*), pero la evidencia actual indica que el mensajero E6*I generaría un producto proteico estable que regula negativamente la actividad de la proteína E6 entera de la que deriva (*96-98*). La principal función descripta para este producto proteico es inhibir la degradación del supresor de tumores p53 mediada por E6; no obstante, se continúan reportando nuevos efectos y blancos celulares para este pequeño polipéptido. Por el contrario, no existe hasta el momento información bioquímica y estructural que aporte a la comprensión de los mecanismos de acción de E6*I.

La ausencia de estudios estructura-función de E6*I puede deberse a cierta dificultad para obtener cantidades suficientes de proteína en sistemas de expresión heterólogos que permitan la realización de estudios biofísicos y bioquímicos en condiciones controladas en solución. Dada la complejidad observada para la proteína E6 entera de la que deriva E6*I, donde se demostró la dificultad de purificarla en una forma estable y plegada, en el desarrollo de esta tesis nos proponemos analizar exhaustivamente las conformaciones y estructuras adoptadas por E6*I en solución y los equilibrios presentes en el conjunto de conformaciones obtenido. Por su tamaño, es poco probable que posea estructura terciaria cooperativa, suponiendo en cambio una estructura dinámica que dé lugar a un conjunto de conformaciones que se encuentran en equilibrio.

Diversos laboratorios realizaron varios intentos para purificar la proteína E6 monomérica en su forma salvaje, aunque con éxito parcial (*76, 78*). Los principales problemas estaban asociados a la obtención de proteína mal plegada en forma de agregados insolubles, la baja estabilidad y la cantidad de proteína purificada, insuficiente para muchos de los estudios biofísicos y bioquímicos que permiten caracterizar estructuralmente una proteína. Por este motivo, hasta el momento no se ha publicado la estructura tridimensional completa de la proteína E6 entera. Esta proteína está compuesta por dos dominios de unión a Zn correspondientes a los residuos 7-83 y 87-153

(E6N y E6C, respectivamente), conectados por un espaciador de 4 residuos (residuos 83-86) y flanqueados por un *loop* N-terminal (residuos 1-6) y un *loop* C-terminal (residuos 54-158) (*80*). La secuencia de E6*I está contenida en el dominio N-terminal de E6.

En estos trabajos se asume que la oncoproteína E6 funcional sería monomérica. Sin embargo, son numerosos los trabajos que reportan la formación de oligómeros y multímeros; interesantemente, nuestro laboratorio y otros grupos demostraron su existencia *in vivo* sugiriendo a la oligomerización como un proceso que ocurre naturalmente en estas proteínas y que posee consecuencias funcionales (*75, 84*).

Actualmente, sólo existe estructura del C-terminal de E6 HPV16 que se obtuvo por RMN utilizando una variante donde se mutaron 4 de sus 8 cisteínas (E6C 4C/4S), con el fin de minimizar problemas de oxidación. Para realizar estas mutaciones, los autores consideraron que: (i) las cisteínas mutadas no se encuentran conservadas en los alineamientos de E6, (ii) el cambio de cisteína por serina es relativamente isostérico, (iii) las mutaciones no previenen que el dominio adopte un plegamiento estable, (iv) todas las posiciones mutadas se encuentran en la superficie de la estructura calculada y, (v) estas mutaciones también se encuentran en la mutante E6 6C/6S de la proteína entera, cuyas propiedades de degradación de p53 tanto *in vitro* como *in vivo* son idénticas a las de la proteína salvaje (*76*).

En un análisis filogenético realizado previamente por Cole y Danos, sugieren que la proteína E6 actual evolucionó de una proteína con un único dominio a través de duplicación génica y, como consecuencia, ambos dominios de E6 podrían adoptar un mismo plegamiento (*58*). La identificación reciente en cepas de papilomavirus aviar de una proteína con sólo un dominio de unión a Zn, altamente soluble y monomérica, constituye la primera evidencia experimental que apoya esta hipótesis planteada en 1987 (*107*). Una proteína similar a la descripta por este grupo pudo haber existido en un ancestro en común entre los PVs de mamíferos y aves. Finalmente, la presencia de un tercer dominio de unión a Zn en PVs de conejo (*108*), enfatiza la hipótesis de un evento de duplicación que pudo haber dado lugar a las actuales proteínas E6, con dos dominios en su estructura.

Por otro lado, en base a la fuerte similitud entre las secuencias de los dominios N- y C-terminal de E6, se hipotetizó que el dominio N-terminal podría adoptar la misma topología obtenida para el C-terminal (*80*). La adición de 2 espacios dentro del *loop*-1 permite la alineación de los dominios N-terminal con los C-terminal de sus correspondientes cepas. En este alineamiento, todos los residuos hidrofóbicos que en la

estructura de E6C 4C/4S se encuentran ocultos al solvente permanecen hidrofóbicos en E6N (*80*).

Además, experimentos de dicroísmo circular donde se observó una estructura α/β comparable en E6N, E6C y E6 entera también sugieren que ambos dominios pueden adoptar un plegamiento similar (*76, 109, 110*). Entonces, utilizando la cadena principal de E6C como molde (Figura 2, Izquierda), los autores construyeron un posible modelo de E6N, donde todos los residuos ocultos al solvente corresponden a posiciones hidrofóbicas conservadas (Figura 2, Derecha).

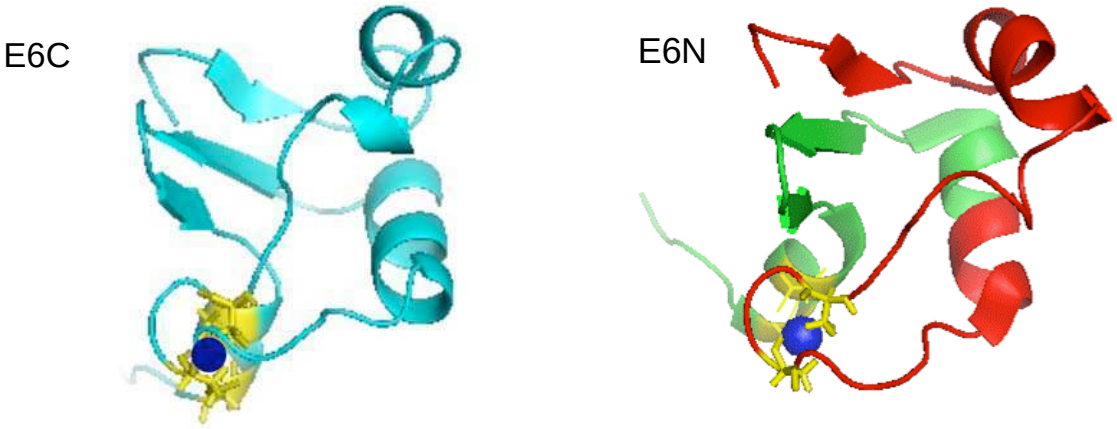


Figura 2. Estructura de E6C y modelo de E6N. Izquierda: representación en cintas de la estructura de E6C. **Derecha:** representación en cintas de la estructura de E6N obtenida por modelado. Con rojo se marcó la porción de aminoácidos correspondiente a la secuencia de E6*I. (Adaptado de Nomine et al (*80*)).

La secuencia de aminoácidos de E6*I HPV16 involucra los primeros 50 aminoácidos de la proteína E6 entera. Al evaluar las posiciones de estos residuos en la estructura sugerida por modelado de E6N, se observa que E6*I abarcaría hasta la mitad de la hélice 2 de esta estructura, indicando claramente que interrumpe un dominio independiente de plegamiento (indicada con rojo en Figura 2, Derecha). En este sentido, E6*I debe necesariamente adoptar una estructura diferente a la adquirida en el contexto de la proteína entera.

En general, el procesamiento alternativo se vincula con la deleción o inserción de zonas regulatorias o de secuencias correspondientes a dominios enteros en proteínas, constituyendo una de las principales fuentes de diversidad funcional. Resulta menos frecuente observar eventos que interrumpan dominios, dado que impediría el plegamiento nativo de la secuencia remanente. Asimismo, se ha propuesto que los sitios de procesamiento alternativo generalmente se encuentran en regiones que codifican

secuencias intrínsecamente desordenadas (IDPs) y que el procesamiento en estas regiones permite incrementar la diversidad funcional y regulatoria con poco o ningún trastorno en la estructura de la proteína (*111*).

La evidencia actual indica que el ARN mensajero E6*I generado por procesamiento alternativo, da origen a un producto proteico estable al que se le atribuyen múltiples efectos como proteína en el contexto viral, siendo el principal efecto el de regular negativamente la actividad de la proteína E6 entera (*97, 112*). Existe suficiente información para confirmar este mecanismo de acción, aunque cuestiones fundamentales respecto del plegamiento de esta proteína no han sido resueltas y son el objeto de estudio de este trabajo. Dada la complejidad observada para la proteína E6 de la que deriva, nos proponemos analizar exhaustivamente las conformaciones y estructuras adoptadas por E6*I en solución y los equilibrios presentes en el conjunto de conformaciones obtenidas.

Un análisis detallado de la bibliografía revela la ausencia de consenso en el inicio de la traducción de E6 de HPV16. Existen 2 ATG iniciales separados por 6 residuos y en la bibliografía se describe de manera indistinta la utilización de la proteína E6 de 151 o 158 aminoácidos (*78, 83, 113*). Esto también daría origen a dos versiones de E6*I con 43 o 50 residuos totales, respectivamente.

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de E6*I para evaluar el grado de conservación de sus metioninas, representándolo en la Figura 2 como un logo de secuencias. El logo fue construido en base al alineamiento de la porción N-terminal de 66 secuencias de E6, donde, en el caso de los tipos de alto riesgo y específicamente de HPV16, corresponde a la secuencia de aminoácidos de E6*I. Este logo permite analizar el grado de conservación de los diferentes residuos: la altura relativa de las letras en cada posición es proporcional a su abundancia, y el eje vertical representa el contenido de información de cada posición, cuyo valor máximo es 4.32 para proteínas (ver Materiales y Métodos).

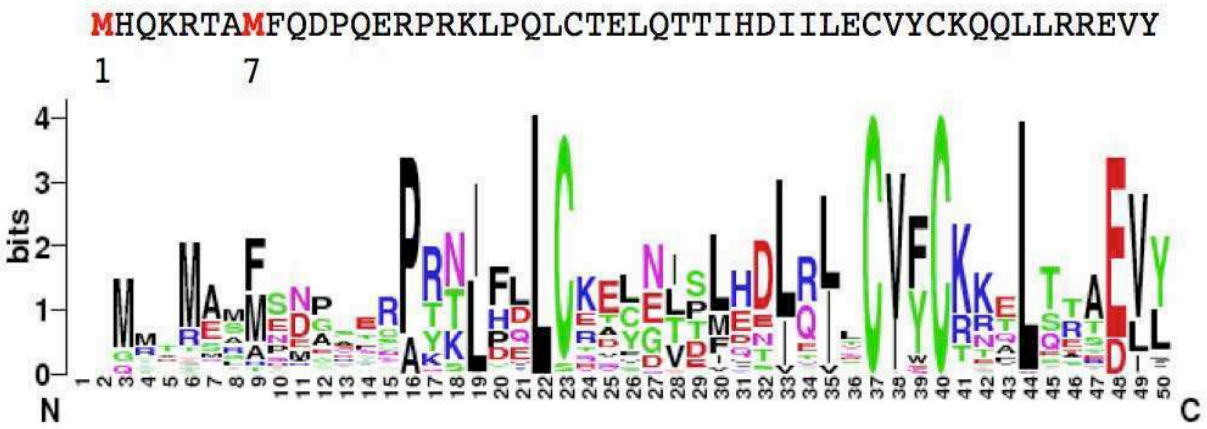


Figura 2. Análisis de conservación de residuos en E6*I. Arriba: secuencia de E6*I HPV16. En rojo se indcan los dos sitios probables de inicio de la transcripción/traducción. **Debajo**: logo de secuencias creado utilizando un alineamiento de 66 secuencias de la porción N-terminal de proteínas E6 de papilomavirus.

Al evaluar el logo, se observa que la metionina inicial (metionina 1) de E6 HPV16 se encuentra ausente mientras que la metionina 7, correspondiente al segundo sitio de inicio de la traducción de esta proteína, está más conservada. Esto implica que sería en este sitio donde comenzaría la secuencia de E6*I HPV16. Por el contrario, todos los estudios que evalúan y reportan el efecto en el contexto celular de construcciones génicas con E6*I, consideran como sitio de inicio de la traducción la metionina 1 de E6, lo que da lugar a una proteína de 50 residuos.

I.1 CONDICIONES DE REPLEGADO DE E6*I EN SOLUCIÓN.

El objetivo inicial de este trabajo consistió en evaluar si un péptido con la secuencia primaria de E6*I que, en el contexto de la proteína entera formaría parte de un dominio independiente de plegamiento, tiene la capacidad de plegarse y adquirir estructura secundaria y terciaria en solución de manera aislada.

Como se mencionó anteriormente, existen en E6 HPV16 dos sitios probables de inicio de la transcripción/traducción que darían origen a dos E6*I que difieren en el largo total de la molécula. Los trabajos celulares que reportan efectos biológicos de E6*I (*94*) utilizan la secuencia correspondiente desde la primera metionina que da origen al péptido E6*$I_{1\text{-}50}$ pero, dado que no es posible descartar la existencia de la versión corta E6*$I_{1\text{-}45}$, nos interesó evaluar comparativamente el comportamiento de ambas especies. Los experimentos se realizaron utilizando péptidos obtenidos por síntesis química, cuyas secuencias son:

- E6*I_{1-50}:

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVY

El peso molecular teórico de E6*I_{1-50} es 6130 Da, determinado utilizando el programa Protparam y confirmado por espectrometría de masas MALDI-TOF. Es un péptido con carácter básico con un punto isoeléctrico (pI) teórico de 8.6.

- E6*I_{1-45}:

MFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVY

El peso molecular teórico de E6*I_{1-45} es 5449 Da; en esta secuencia la ausencia de los primeros aminoácidos, varios con cargas positivas, modifican sustancialmente el pI del péptido, siendo ahora de 6.4.

El primer paso en el estudio conformacional de un péptido es encontrar condiciones de solubilidad donde poder analizar sus propiedades conformacionales por métodos espectroscópicos. Inicialmente, los péptidos se solubilizaron con cloruro de guanidinio (Gdm.Cl) a altas concentraciones (6.0M) y se diluyeron en distintas soluciones para encontrar una condición óptima de replegado. El parámetro de análisis que se utilizó para evaluar la eficiencia del replegado fue el análisis del contenido de estructura secundaria adquirida en las diferentes condiciones exploradas. Las condiciones de solubilidad exploradas incluyen variables como pH, temperatura, fuerza iónica, agentes reductores, detergentes y distintos esquemas temporales de dilución que conciernen a los efectos cinéticos del replegado proteico.

Es importante destacar que cualitativamente los péptidos E6*I_{1-50} y E6*I_{1-45} mostraron una baja solubilidad general que obligó a resuspenderlos en Gdm.Cl en lugar de utilizar algún *buffer* acuoso. Esta baja solubilidad inicial también se tradujo en una alta tendencia a la precipitación luego de diluir el agente desnaturalizante en las condiciones de replegado.

La técnica espectroscópica que permite obtener información del tipo y la cantidad de estructura secundaria presente en una proteína es el dicroísmo circular (DC) (*114*). Esta técnica se basa en la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada por parte de las proteínas. Según la región del espectro que se analice se obtendrá información de la cantidad y calidad de estructura secundaria en el UV lejano (180 a 260 nm) o de la estructura terciaria cuando se analice en el UV cercano (260 a 340 nm). El cromóforo que absorbe en el UV lejano es el enlace peptídico (amida) y su absortividad molar depende del tipo de estructura secundaria de la que se encuentre formando parte. Por ejemplo, el espectro de DC en el UV lejano para un péptido modelo en estructura

hélice-α consiste en un máximo a 195 nm y dos mínimos alrededor de 208 y 222 nm; para el caso de un péptido en lámina-β, en general se observa un máximo alrededor de 190 nm y un mínimo variable entre 214 y 218 nm, dependiendo del tipo de lámina-β, mientras que péptidos y proteínas desestructuradas presentan baja intensidad negativa en la región 210-225 nm y un mínimo pronunciado por debajo de 200 nm.

La Figura 3A muestra los diferentes espectros de DC obtenidos para E6*I_{1-50} en las distintas condiciones evaluadas; en el gráfico se encuentra representada la elipticidad cruda que no se normalizó por concentración, por lo que los cambios en el espectro reflejan tanto diferentes conformaciones como solubilidades.

Se observa en los espectros una gran variabilidad cualitativa y cuantitativa con el pH de la solución de replegado; macroscópicamente se obtuvo mayor precipitado particulado a pH neutros, cercanos a 7.0, que a pH ácidos, cercanos a 5.0.

La condición donde se obtiene mayor señal de DC en el UV lejano, y en este experimento mayor solubilidad, es en *buffer* acetato de sodio pH 5.0. En este espectro no predomina ninguno de los tipos canónicos de estructura secundaria; presenta un máximo a 195 nm y un mínimo alrededor de 210 nm sugiriendo que a este pH podrían coexistir más de un tipo de estructura secundaria en el péptido E6*I_{1-50}. Es posible que este espectro sea la combinatoria de algún grado de estructuración del tipo lámina-β (mínimo a 217 nm) sumado a la contribución de una conformación desordenada (mínimo a 200 nm) (Figura 3A).

Un aumento de 0.6 unidades de pH (pH 5.6), disminuyó sustancialmente la cantidad de estructura secundaria obtenida, manteniendo la forma del espectro. En el resto de las condiciones evaluadas, correspondientes a pH > 5.6, se obtuvieron espectros con menor contenido de estructura secundaria y características de péptido desestructurado. Por ejemplo, el espectro de DC en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 muestra un mínimo < 205 nm y un hombro a 220 nm, indicativo de algún grado de estructuración no canónica (Figura 3A). Es importante resaltar que además de las diferencias cualitativas en los espectros de DC a los distintos pH, existen diferencias en la cantidad de péptido remanente en solución.

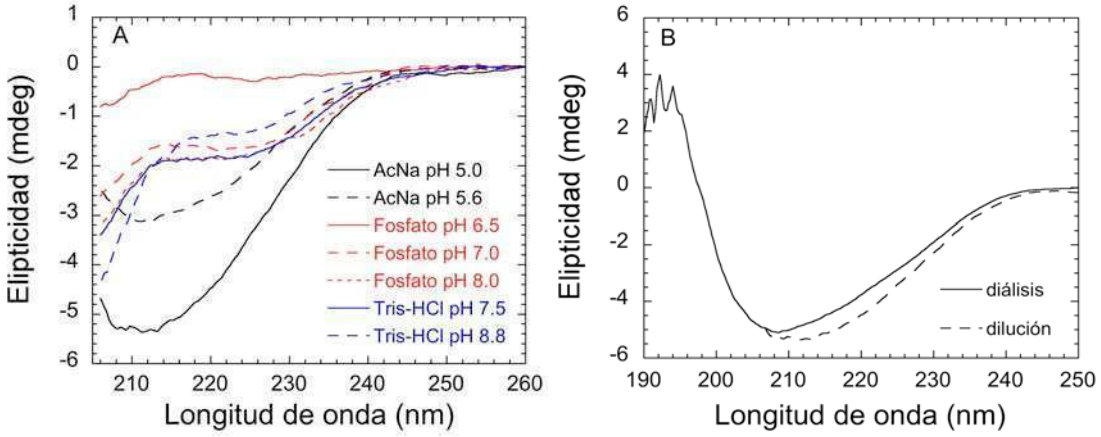


Figura 3. Replegado de E6*I_{1-50} analizado por Dicroísmo Circular (DC). Espectros de DC en el UV lejano **(A)** obtenidos luego de diluir la solución madre de E6*I_{1-50} en 6.0M Gdm.Cl en soluciones 20mM de los distintos *buffers* analizados. **(B)** Espectros de E6*I_{1-50} obtenidos por dilución (línea punteada) y por diálisis (línea continua) en 20mM *buffer* acetato de sodio pH 5.0.

El diseño experimental utilizado se basa en la dilución 1/10 en un *buffer* de replegado de una solución madre de péptido conteniendo 6.0M Gdm.Cl. Así, la concentración residual de Gdm.Cl es de 0.6M en las condiciones de medida, pudiendo afectar la estructura a adquirir por E6*I_{1-50}; por este motivo, se dializó E6*I_{1-50} en una solución de acetato de sodio pH 5.0 y se midió el espectro de DC correspondiente al péptido en ausencia de Gdm.Cl. Los espectros obtenidos en presencia y ausencia de Gdm.Cl son mayormente superponibles (Figura 3B), concluyendo que en esta condición bajas concentraciones de Gdm.Cl no afectan la estructura secundaria de E6*I_{1-50}.

Estos experimentos constituyen la primer evidencia de la capacidad de E6*I_{1-50} de adquirir estructura en solución, obteniendo a pH 5.0 un espectro de DC con elementos de estructura secundaria tipo lámina-β.

Al realizar el experimento de replegado por dilución con E6*I_{1-45}, no se obtuvieron condiciones cuyos espectros de DC presentaran elementos de estructura secundaria canónicos (Figura 4), como sí ocurre con E6*I_{1-50}. Las condiciones donde se obtuvieron mayor solubilidad son en *buffer* Tris-HCl pH 8.8 y *buffer* acetato de sodio pH 5.0. Sin embargo, la diálisis a este último pH provocó una fuerte agregación macroscópica que imposibilitó realizar experimentos comparativos con E6*$I_{1-50,\ pH\ 5.0}$. Esta diferencia puede estar asociada a la diferencia entre los pI de ambas moléculas.

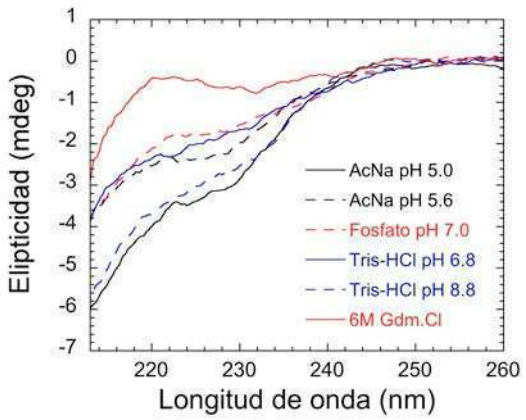


Figura 4. Replegado de E6*I_{1-45} analizado por Dicroísmo Circular (DC). Espectros de DC en el UV lejano obtenidos luego de diluir la solución madre de E6*I_{1-45} en 6.0M Gdm.Cl en soluciones 20mM de los distintos *buffers* analizados.

I.2. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE E6*$I_{1-50,\ pH\ 5.0}$.

En el laboratorio se demostró que la proteína E6 HPV16 entera de la que deriva la secuencia de E6*I_{1-50}, precipita en presencia de cloruro de sodio (*75*). Este hecho nos llevó a analizar el comportamiento de E6*$I_{1-50,\ pH\ 5.0}$ frente al agregado de diferentes concentraciones de este reactivo. Se tituló la muestra con NaCl y se midió el espectro de DC en el UV lejano en cada punto de la titulación, sin observarse modificaciones en la forma y en la cantidad de estructura secundaria obtenida (Figura 5B). Al finalizar el experimento se centrifugó la muestra y se tomó nuevamente un espectro de DC, obteniéndose una gran pérdida de señal. Para evaluar si la precipitación se debía a las altas concentraciones de sal alcanzadas en la titulación, se analizó el espectro de DC obtenido para E6*I en presencia de 100mM NaCl antes y después de centrifugar (Figura 5B). El resultado obtenido coincide con el observado a altas concentraciones de sal donde la centrifugación de la muestra genera una pérdida de señal en el espectro de DC. Estos resultados sugieren la presencia de oligómeros meta-estables que salen de solución luego de la centrifugación, y esto ocurre de manera proporcional a la fuerza iónica.

Es posible observar, sin embargo, que previo a la centrifugación e independientemente del estado de oligomerización del péptido (0M vs 1M NaCl) la intensidad y forma general del espectro de DC no varía significativamente. Esto sugiere un proceso de agregación ordenado a una especie que mantiene las características

espectroscópicas, diferenciándolo claramente de un proceso de precipitación o agregación insoluble.

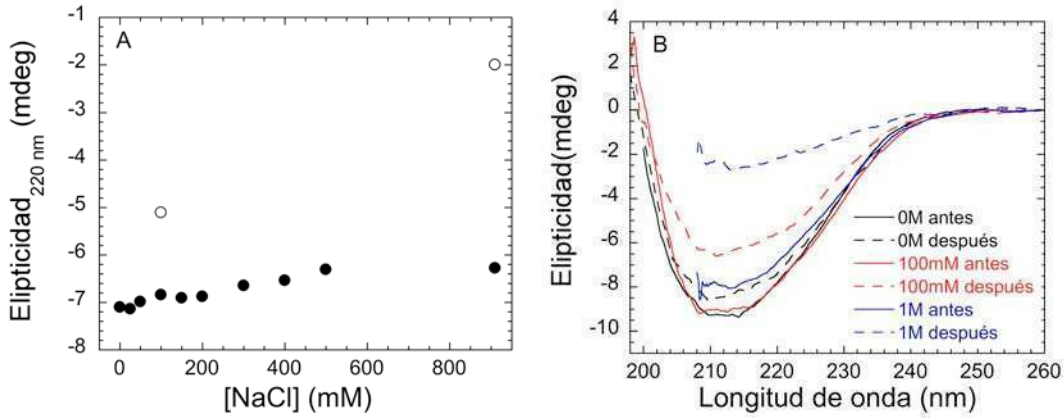


Figura 5. Efecto del NaCl sobre la estructura secundaria de E6*$I_{1-50,\ pH\ 5.0}$. (A), Elipticidad a 220 nm en función de la concentración de NaCl (mM). Se tituló 10μM E6*I_{1-50} en 20mM *buffer* acetato de sodio pH 5.0. Los círculos llenos corresponden a E6*I_{1-50} antes de centrifugar y los círculos vacíos después de centrifugar. **B),** Espectros de DC en el UV lejano de 10μM E6*I_{1-50} en *buffer* acetato de sodio pH 5.0 antes (línea continua) y después (línea partida) de centrifugar en: 0M NaCl (línea negra), 100mM NaCl (línea roja) y 1M NaCl (línea azul).

Existen en la literatura varios ejemplos de proteínas o péptidos no relacionados en su función o estructura nativa, con tendencia a formar estructuras amiloides solubles que finalmente llevan a la formación de agregados ordenados del tipo fibra (*115*). Estas estructuras amiloides se caracterizan por auto-ensamblarse mediante estructuras beta-repetitivas.

Muchas proteínas provenientes de HPV han demostrado ser capaces de ensamblarse en fibras amiloides (*116, 117*) u oligómeros solubles con características amiloides (*47, 49*); incluso se ha descripto la formación de estructuras amiloides funcionales para la proteína E1^E4 de la cepa HPV16 (*116*). La proteína E6 entera de la cual deriva E6*I, también forma estructuras de alto peso molecular. En nuestro laboratorio se demostró la formación de oligómeros solubles con alto contenido de hélice alfa (E6SOs), que se detectaron en células naturalmente transformadas por HPV utilizando anticuerpos policlonales desarrollados contra E6SOs (*75*). Posteriormente, Zanier et al confirmaron esto y mostraron que además E6 provenientes de varios tipos de HPV tienen la tendencia a formar oligómeros y multímeros, tanto *in vitro* como *in vivo (84)*.

Por otro lado, el espectro de dicroísmo circular de E6*$I_{1-50,\ pH\ 5.0}$ presenta un componente de lámina-β marcado, similar al observado para este tipo de estructuras con características amiloides.

En la práctica, es relativamente sencillo diferenciar mediante centrifugación una fibra amiloide (insoluble) de un oligómero con características amiloides (soluble); asimismo, el mecanismo de ensamblado de una fibra amiloide (producto final) transcurre por una serie de estos intermediarios solubles (*118*). Como se mencionó previamente, cuando se miden espectros de DC a una muestra de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ antes y después de centrifugar, no se observan diferencias cuantitativas entre los mismos (Figura 5B) indicando que se trata de una especie soluble. Sin embargo, esta especie soluble podría ser un monómero, un oligómero de bajo peso molecular (por ejemplo, dímero, trímero, tetrámero) o formar parte de un ensamblado de alto peso molecular. El comportamiento frente al agregado de fuerza iónica sugiere la presencia en E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ de oligómeros meta-estables, que agregan de manera ordenada luego de centrifugarlos.

Una característica de los oligómeros amiloides es su termo-resistencia. Por este motivo, se evaluó la estabilidad térmica de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ mediante ensayos de desnaturalización térmica aplicando un gradiente de temperatura entre 20℃ y 85°C a una velocidad de barrido de 5°C/min. Se monitoreó la señal de DC a 220 nm en función de la temperatura y se midieron espectros al inicio del experimento, a la máxima temperatura alcanzada y luego de enfriar la muestra.

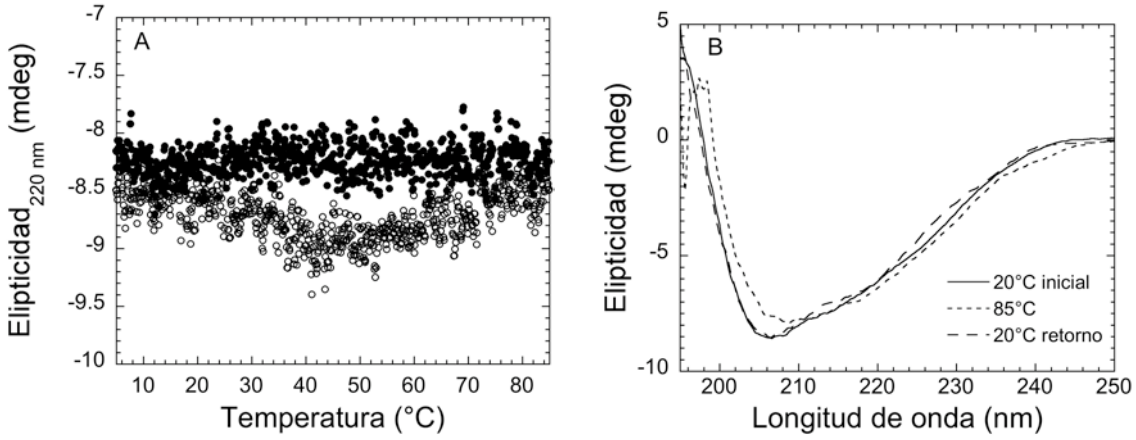


Figura 6. Desnaturalización térmica de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$. (A) Elipticidad a 220 nm en función de la temperatura, en barridos desde 20℃ hasta 85℃ (círculo vacío) y desde 85℃ hasta 20℃ (círculo negro). **(B)** Espectros de DC en el UV lejano de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ nativa (línea entera), después de la termodesnaturalización (línea punteada) y luego de bajar la temperatura nuevamente a 20℃ (línea partida).

En este ensayo no se observa una pérdida sustancial en la estructura secundaria del péptido (Figura 6A) y los espectros al inicio del experimento y luego de disminuir la temperatura nuevamente a 20℃ son superponibles (Figura 6B), por lo que se puede concluir que la especie E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ es termo-resistente.

Finalmente, tanto la agregación ordenada observada en presencia de NaCl, con la concomitante formación de un pellet gelatinoso, como la termo-resistencia sugieren fuertemente que E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ es una especie oligomérica.

I.3. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$.

Con el objetivo de profundizar en el análisis de la probable existencia de oligómeros en la muestra de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$, inicialmente se evaluó su estructura cuaternaria mediante la técnica de dispersión de luz láser (DLS). Brevemente, el ruido de la luz dispersada reporta la velocidad del movimiento Browniano de las partículas presentes. Mediante la relación de Einstein-Stokes que explica la difusión de partículas esféricas a través de líquidos, es posible calcular el diámetro de la molécula. Así, el DLS brinda información respecto al radio hidrodinámico de Stokes de las partículas presentes en solución (*119*), que sólo en el caso de proteínas globulares permite obtener un valor de peso molecular.

El análisis por DLS de una muestra de E6*I a una concentración de 0.12mg/ml reveló la presencia de una especie mayoritaria de partículas de radio hidrodinámico promedio de 32nm (Figura 7), aunque no es posible descartar heterogeneidades que no se estén detectando por esta técnica. El valor obtenido corresponde al radio hidrodinámico de una partícula globular de 2.2 MDa, siendo el valor teórico esperado para el radio hidrodinámico de una molécula globular del peso molecular de E6*I de 1.2nm.

Este resultado confirma que la especie de E6*$I_{1\text{-}50\ pH\ 5.0}$ es un oligómero soluble con alto contenido de estructura beta.

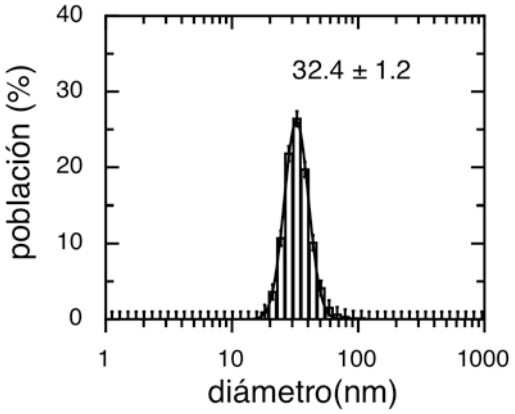


Figura 7. Dispersión de Luz Láser Dinámica (DLS) de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$. Diámetro de E6*$I_{1\text{-}50}$ 20μM en 20mM *buffer* acetato de sodio pH 5.0 determinado por la técnica de DLS.

I.3.1. Morfología de los oligómeros obtenidos.

El análisis por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) proporciona información respecto de la morfología de las estructuras presentes en una muestra. Esta técnica consiste en el barrido de la muestra en tres dimensiones mediante un pico o *tip* de punta muy fina permitiendo obtener una foto de la topografía de la muestra. A diferencia de la técnica de DLS, la fuerte interacción de las especies con el soporte de medición en AFM puede deformar las geometrías de las mismas aplanándolas.

Las imágenes obtenidas (Figura 8) para una muestra de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ a una concentración de 0.0012mg/ml presentan dos tipos de poblaciones predominantes: una esférica, de menor tamaño y otra con forma de fibras tipo gusanos, de las cuales las esferas podrían ser sus unidades formadoras, similares a las estructuras observadas en fibras tipo amiloides.

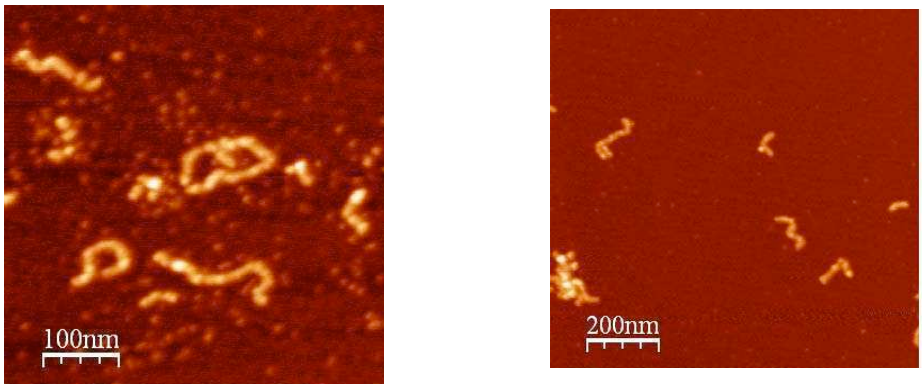


Figura 8. Visualización de los oligómeros de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). Imágenes de AFM de E6*$I_{1\text{-}50}$ 0.2μM en *buffer* acetato de sodio pH 5.0; **Izquierda:** la escala xy corresponde a 1μM. **Derecha:** la escala xy corresponde a 0.5μM.

Estas imágenes sugieren una naturaleza amiloide de la especie de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$.

*I.3.2. Unión a Tioflavina T de los oligómeros de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$.*

Finalmente, y en base a la información obtenida respecto a E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$, se evaluó la unión de estas estructuras al colorante Tioflavina T, reactivo ampliamente utilizado en la caracterización de fibras amiloides (*120*). La Tioflavina T se une a estructuras lámina-β repetitivas generando un aumento en su emisión de fluorescencia a 490 nm.

En la figura 9 se observa que la unión de los oligómeros de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ provoca un incremento en la señal de fluorescencia del colorante, como también ocurre con los oligómeros con hojas β-repetitivas E7SOs, utilizados como control positivo (*47*).

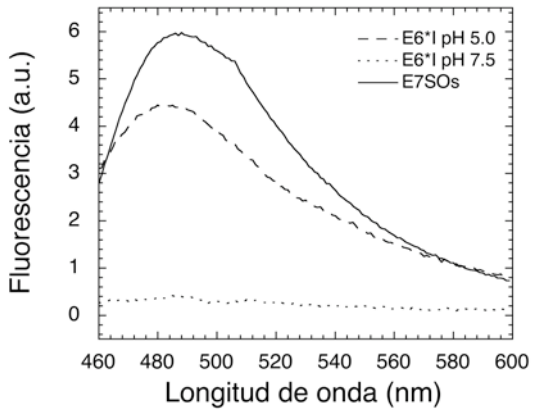


Figura 9. Unión del colorante Tioflavina T (ThT) a E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$. Unión de ThT a E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$ (línea partida), E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 7.5}$ (línea punteada) y E7SOs (línea entera), utilizado como control positivo. A cada muestra se le sustrajo la contribución de ThT libre.

En conjunto, la estructura secundaria tipo lámina-β, la formación de estructuras solubles de alto peso molecular que en presencia de fuerza iónica agregan formando precipitados con apariencia gelatinosa, y la visualización por AFM de fibras tipo gusanos que finalmente unen ThT, confirman la naturaleza amiloidea de la especie de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 5.0}$. Estas estructuras tipo amiloideas han sido observadas *in vitro* para numerosos péptidos y proteínas, muchas de las cuales se encuentran involucradas en diversas patologías humanas. Además, como se mencionó previamente, se ha demostrado la formación de estas estructuras tanto *in vitro* como *in vivo* por parte de varias proteínas derivadas de HPV.

I.4. E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 7.5}$.

*I.4.1. Análisis de la estructura secundaria de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 7.5}$.*

Parte de nuestros objetivos consistían en determinar las propiedades conformacionales de E6*$I_{1\text{-}50}$ en condiciones de entorno consideradas "fisiológicas", donde se espera que el péptido actúe y participe de interacciones. A diferencia de lo observado a pH 5.0, la solubilidad del péptido a pH neutro o básico era marginal.

En la figura 11A se representa el espectro obtenido replegando por dilución una solución madre de E6*$I_{1\text{-}50}$ (6.0M Gdm.Cl) en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, donde se observa un espectro con características de un péptido aparentemente desordenado, sin elementos de estructura secundaria canónicos. Varios fueron los intentos de replegar la proteína a pH 7.5 en ausencia de Gdm.Cl, aunque las diálisis a este pH provocaban la precipitación

macroscópica del péptido. Esto se debía, al menos parcialmente, a oxidaciones intermoleculares mediadas por las tres cisteínas que contiene E6*I_{1-50} como se observó en geles SDS-PAGE no reductores (no mostrado).

Por este motivo, la estrategia que se utilizó fue solubilizar el péptido en el solvente orgánico acetonitrilo y a partir de esta solución madre concentrada replegarlo por dilución a un *buffer* a pH 7.5 en presencia de un agente reductor fuerte. El espectro de DC obtenido para esta especie presenta ahora dos mínimos característicos de estructura secundaria tipo hélice-α, uno a 208 nm y el otro a 222 nm y un máximo alrededor de 198 nm (Figura 10A). A diferencia de E6*$I_{1-50,\ pH\ 5.0}$, esta especie tiende a precipitar y permanece en solución sólo por unas horas, comportamiento que impidió realizar una caracterización extensa de E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$ en ausencia de Gdm.Cl.

A pH 5.0 el replegado por dilución no afectó la cantidad y el tipo de estructura secundaria adquirida (Figura 3B). En cambio, E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$ en presencia de bajas concentraciones de Gdm.Cl no puede adoptar la estructura tipo hélice-α observada en ausencia del desnaturalizante, indicando una menor estabilidad de la especie obtenida a pH 7.5 respecto de la obtenida a pH 5.0 (Figura 10A).

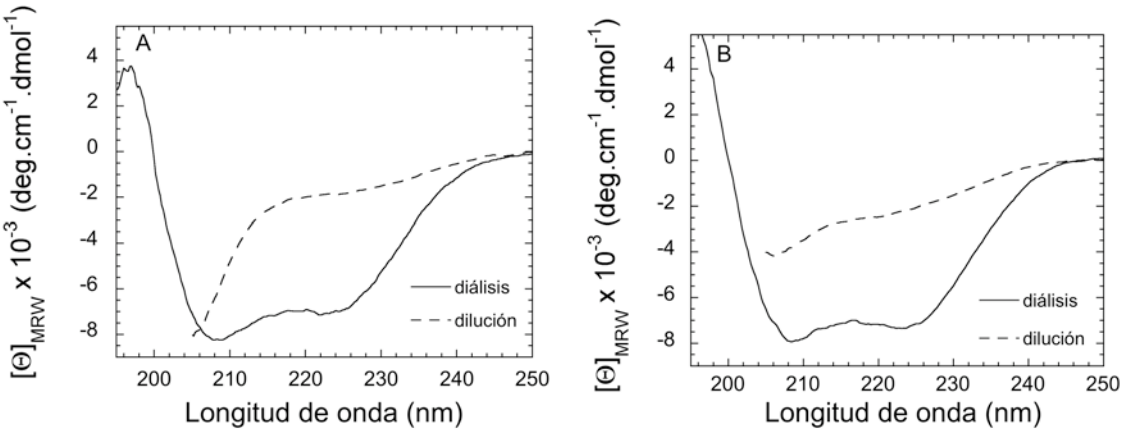


Figura 10. Análisis de la estructura secundaria de E6*I_{1-50} y E6*I_{1-45} a pH neutro. (A) Espectros de DC en el UV lejano de E6*I_{1-50} obtenidos por dilución (línea punteada) y por diálisis (línea continua) en 20mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5. **(B)** Espectros de E6*I_{1-45} obtenidos por dilución (línea punteada) y por diálisis (línea continua) en 20mM *buffer* Tris-HCl pH 8.8. Todas las condiciones contienen TCEP como agente reductor.

Por otro lado, las condiciones de mayor solubilidad obtenidas luego de replegar por dilución la solución madre de E6*I_{1-45}, fueron los *buffers* Tris-HCl pH 8.8 y acetato de sodio pH 5.0. En ambas soluciones se obtuvieron espectros de DC con características de péptido desordenado (Figura 4). En base a lo observado para E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$, se dializó E6*I_{1-45} en las dos condiciones con mayor eficiencia de replegado en busca de una

condición donde E6*I_{1-45} adquiriera elementos de estructura secundaria canónicos. Luego de dializar E6*I_{1-45} en *buffer* acetato de sodio pH 5.0 no se obtuvo péptido remanente soluble para utilizar en mediciones de DC, debido a la fuerte precipitación macroscópica de la muestra. En cambio, en *buffer* Tris-HCl pH 8.8 se obtuvo péptido cuyo espectro es característico de estructura secundaria tipo hélice-α con dos mínimos alrededor de 208 nm y 222 nm (Figura 10B). Este espectro coincide con el observado para E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$, y como también ocurre con esta especie, no se obtiene el mismo tipo de estructura secundaria replegando el péptido por dilución comparado con diálisis. El Gdm.Cl residual que permanece luego de diluir E6*I_{1-45} no le permite adoptar la conformación de hélice-α observada en ausencia de Gdm.Cl, obteniéndose en presencia de bajas concentraciones de desnaturalizante un espectro de DC con características de péptido desordenado; se observa una disminución de la banda negativa alrededor de 220 nm y el mínimo a 208 nm se desplaza hacia longitudes de onda menores (Figura 10B).

A pH neutro dos factores como el estado de oxidación de sus cisteínas y la coordinación de Zn por estos residuos, toman protagonismo fundamental en la conformación de E6*I. Estos aspectos se describirán detalladamente en el capítulo III, sin embargo, en esta sección se analizará su impacto en las propiedades conformacionales y de oligomerización del péptido. La importancia de estos dos factores radica en que E6*I posee la mitad de un motivo de unión a Zn que en la proteína E6 entera constituye un dominio conocido como *Zn finger* y que en ausencia de metal sus cisteínas tienden a oxidar espontáneamente. Además, la especie reactiva de la cisteína es el tiolato y esta es la especie representativa a pH neutro o básico.

La Figura 11 muestra que el replegado tanto de E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$ (Figura 11A) como de E6*$I_{1-45,\ pH\ 8.8}$ (Figura 11B) en presencia de Zn provoca la pérdida de la estructura secundaria tipo hélice-α, obteniendo ahora un espectro de un péptido aparentemente desordenado pero con características únicas que indican la existencia de estructura secundaria residual. Se observa un hombro negativo a 228 nm y uno positivo alrededor de 217 nm; además, el mínimo a 198 nm, típico de una conformación extendida o desestructurada, está desplazado hacia 203 nm. Este espectro es claramente diferente al obtenido en 6.0M Gdm.Cl, condición en la que E6*I se encuentra totalmente desplegado (no mostrado).

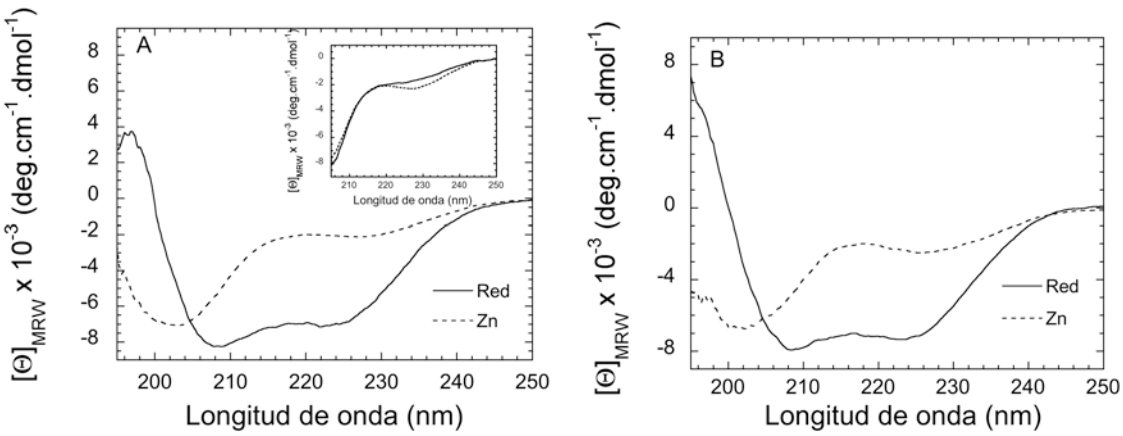


Figura 11. Análisis del efecto del Zn en el replegado de E6*I_{1-50} y E6*I_{1-45} a pH neutro. Espectros de DC en el UV lejano de **(A)** E6*I_{1-50} replegada en 20mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en ausencia (línea entera) y presencia de Zn (línea punteada). **Inserto**: E6*I_{1-50} en 20mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 0.6M Gdm.Cl en ausencia (Red-línea entera) y presencia de Zn (Zn-línea punteada) **(B)** E6*I_{1-45} en 20mM *buffer* Tris-HCl pH 8.8 en ausencia (Red-línea entera) y presencia de Zn (Zn-línea punteada). Todas las condiciones contienen TCEP como agente reductor.

Al comparar los espectros de E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$ replegado en presencia de metal en 0M Gdm.Cl (Figura 11A) respecto de 0.6M Gdm.Cl (Figura 11A, inserto), se observa que bajas concentraciones de Gdm.Cl en la solución no afecta la estructura secundaria adquirida. Esto indica una mayor estabilidad de la especie con Zn respecto de la especie reducida en ausencia del metal.

Los resultados hasta aquí expuestos muestran una drástica modificación de la estructura de E6*I dependiendo del pH de la solución. Además, constituye la primera evidencia respecto de la unión a Zn por parte de este producto de procesamiento alternativo que sólo contiene la mitad de un motivo de unión a este metal. En este caso, observamos que el Zn impide la formación de la estructura secundaria tipo hélice-α observada con E6*$I_{1-50\ pH\ 7.5}$.

*I.4.2. Análisis de la estructura cuaternaria de E6*$I_{1-50\ pH\ 7.5}$.*

En base a la información obtenida para E6*$I_{1-50,\ pH\ 5.0}$, fue de interés analizar si E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$ también sostenía su estructura secundaria a través de la oligomerización. Para evaluar esto, se realizó un análisis del radio hidrodinámico de E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$ por filtración en tamiz molecular utilizando una matriz Superdex 75. La columna se equilibró con 50mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5 y 0.2M Gdm.Cl, que se agregó para evitar interacciones con la matriz de la columna. La Figura 12 muestra que E6*$I_{1-50,\ pH\ 7.5}$ también forma estructuras de alto peso molecular que eluyen en el V_0 de la columna y que esta

oligomerización se evita con el agregado de Zn al péptido. En presencia del metal se obtiene una especie que eluye a los 17ml, correspondiendo a una proteína globular de 11KDa. Dado que por DC se ve que en esta condición E6*I está extendida, no es posible determinar mediante esta técnica si es un dímero o un monómero extendido. Por su parte, E6*$I_{1\text{-}45}$, $_{pH\ 8.8}$ también forma oligómeros solubles que eluyen en el V_0 de una columna S75 (no mostrado).

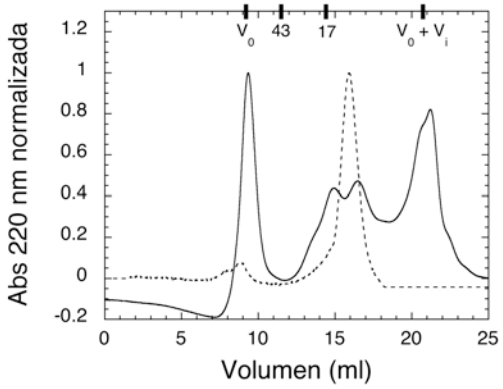


Figura 12. Análisis de la estructura cuaternaria de E6*$I_{1\text{-}50,\ pH\ 7.5}$. Cromatografía de exclusión por tamiz molecular de E6*$I_{1\text{-}50}$ replegada en 20mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en ausencia (línea entera) y presencia de Zn (línea punteada). Se utilizó una columna Superdex 75 y se agregó 0.2M Gdm.Cl al *buffer* de corrida para evitar la interacción con la matriz. Ambas muestras contienen TCEP como reductor. Los volúmenes de elución de las proteínas globulares utilizadas como marcadores de peso molecular (KDa), el V_0 y $V_0 + V_i$ están indicados con barras.

Como conclusión, a pHs neutros y levemente alcalinos ambas moléculas se pliegan formando oligómeros de alto peso molecular con elementos de estructura secundaria tipo hélice-α, a juzgar por sus espectros de DC. Estas especies modifican sustancialmente su estructura secundaria y grado de oligomerización frente al replegado en presencia de Zn, sugiriendo un rol importante de las cisteínas en el plegado y estabilidad de este pequeño polipéptido cuya información bioquímica o estructural es escasa. Finalmente, las propiedades conformacionales observadas para E6*I son independientes del sitio de la traducción utilizado por la maquinaria celular, por lo que en adelante se utilizará a E6*$I_{1\text{-}50}$ como modelo de estudio para responder los interrogantes generados a lo largo de esta tesis (E6*$I_{1\text{-}50}$ denominado en adelante E6*I).

I.5. EXPRESION RECOMBINANTE DE E6*I: EVIDENCIAS DE UNA SECUENCIA "*LEADER*" DE AGREGACION.

Con el objetivo de producir el péptido de forma recombinante, a partir de la secuencia de E6 HPV16 se clonó E6*I en diferentes vectores de expresión. Los resultados de los ensayos de expresión mostraron que la única construcción con la que se obtuvieron niveles de expresión elevados de la proteína de interés, es el vector pGPG (Figura 13A). Este plásmido contiene un codón de iniciación (ATG) seguido de la proteína CI2 y un péptido señal que permite la traslocación al periplasma bacteriano. El promotor del vector pGPG es phoA que se reprime por altas concentraciones de fosfato, siendo necesaria la expresión de estas construcciones en medio mínimo (*121*). La expresión en periplasma puede ofrecer varias ventajas sobre la expresión en citoplasma, incluyendo baja proporción de proteínas de las células hospedantes, menor degradación de la proteína recombinante y un entorno oxidante que facilita el plegamiento proteico adecuado. Además, aunque los niveles totales de proteína a obtener serán menores, la expresión en medio mínimo puede ser una ventaja al simplificar el posterior proceso de purificación.

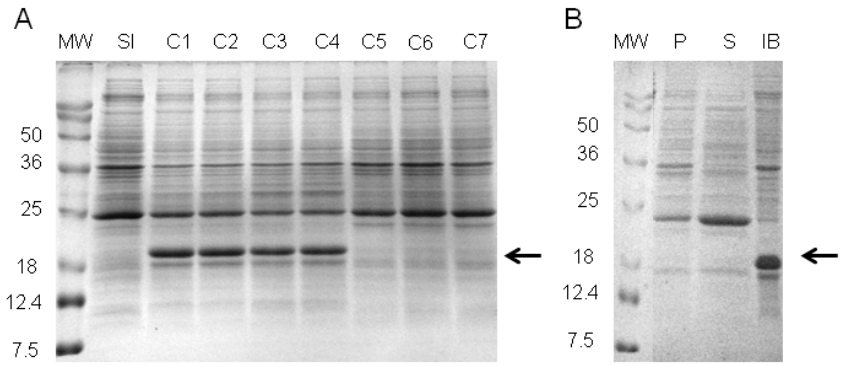


Figura 13. Expresión recombinante de E6*I en el vector pGPG. (A) SDS-PAGE con clones sin inducir (**SI**) en 5.0mM fosfato e inducidos (**C1-C7**) en 0.1mM fosfato. **(B)** SDS-PAGE de análisis de localización subcelular de CI2-E6*I; **P**: periplasma, **S**: soluble, **IB**: insoluble (cuerpos de inclusión); **MW**: marcadores de peso molecular, que se indican en KDa. Las flechas indican la posición de la banda correspondiente a CI2-E6*I.

Se confirmó la identidad de la banda de expresión observada en los clones 1, 2, 3 y 4 por *western blot,* utilizando un anticuerpo monoclonal desarrollado en esta tesis (ver capítulo IV).

Como la construcción seleccionada posee un péptido señal de localización periplásmatica se evaluó la presencia de E6*I en esta fracción proteica mediante métodos de extracción con sacarosa (ver Materiales y Métodos) y posterior análisis en geles SDS-

PAGE (Figura 13B). Como se observa en la Figura 13B, en las condiciones de expresión utilizadas, CI2-E6*I se encuentra principalmente en la fracción insoluble o cuerpos de inclusión (IBs) de la bacteria. Este comportamiento también fue observado recurrentemente por diferentes grupos para la proteína E6 entera.

De cualquier manera, la obtención de la proteína de interés en los IBs de las bacterias constituye una ventaja porque se encuentra en una alta proporción respecto del resto de las proteínas de la bacteria, lo que implica menores pasos de purificación en los protocolos a realizar. No obstante, requiere determinar las condiciones en las que se extrae de esta fracción y posteriormente las condiciones óptimas de replegado; esta última instancia constituye el paso limitante para trabajar con proteínas a partir de IBs bacterianos.

Inicialmente se evaluaron las condiciones de solubilización de CI2-E6*I, y se observó que se obtienen mayores cantidades de proteína en la fracción soluble utilizando Gdm.Cl como agente desnaturalizante (Figura 14A).

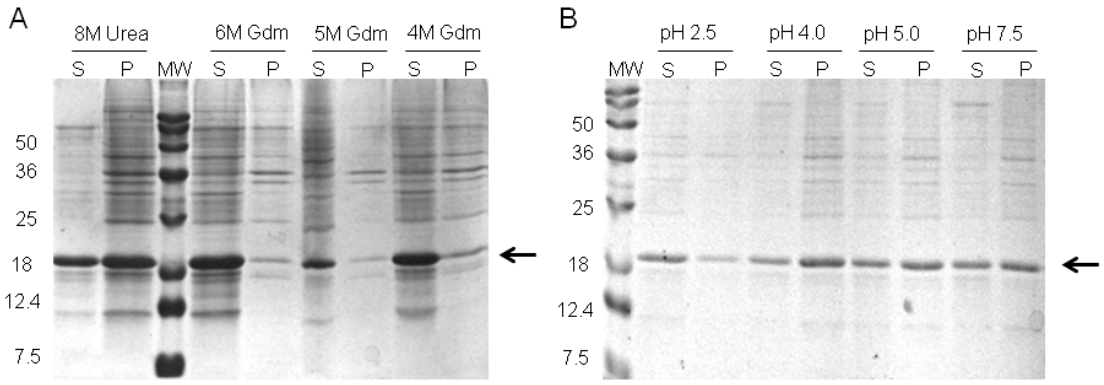


Figura 14. Solubilización y replegado de IBs de CI2-E6*I. (A) Gel SDS-PAGE correspondiente al análisis de las distintas condiciones de solubilización. El *buffer* utilizado es Tris-HCl pH 7.5 con reductor, en presencia de las distintas concentraciones y tipo de desnaturalizantes indicadas en la parte superior. **S**: fracción soluble; **P**: fracción insoluble. **(B)** Gel SDS-PAGE correspondiente al análisis del replegado de CI2-E6*I en los diferentes pHs indicados. Todas las condiciones contienen reductor y Tween 20. **S**: fracción soluble, **P**: fracción insoluble. **MW**: marcadores de peso molecular que se indican en KDa. Las flechas indican la posición de la banda correspondiente a CI2-E6*I.

Posteriormente se realizaron numerosos ensayos en busca de condiciones que permitiesen el replegado de la proteína de fusión a su forma nativa. Brevemente, se diluyó la muestra de proteína solublilizada en 6.0M Gdm.Cl en diferentes soluciones y se analizó la fracción de proteína soluble e insoluble recuperada luego de la dilución. Las condiciones de solubilidad exploradas incluyen variables como el pH, temperatura, fuerza iónica, agentes reductores y detergentes, como se realizó con el péptido sintético.

En la Figura 14B se representa un ejemplo del resultado obtenido con las múltiples condiciones exploradas donde se observa que, independientemente de la combinación de variables utilizada en cada ensayo, el replegado de CI2-E6*I era parcial; se obtenían cantidades sustanciales de la proteína tanto en la fracción soluble como en la fracción insoluble. Es importante resaltar que la proteína CI2 es una proteína altamente soluble en un amplio rango de pHs y concentraciones, propiedad que se modifica al fusionar E6*I a su extremo C-terminal.

A la luz de los resultados expuestos, se eligieron dos condiciones de replegado (pH 5.0 y pH 7.5) que posteriormente se utilizaron para purificar a través de columnas de intercambio iónico. Todos los intentos de purificación a partir de proteína replegada en ausencia o baja concentración de Gdm.Cl fallaron (no mostrado), puesto que no fue posible separarla de otros contaminantes y finalmente la ausencia de desnaturalizante llevaba a la precipitación sustancial de la muestra. Cabe destacar que este fenómeno también fue observado con el péptido sintético.

Considerando la información obtenida respecto al péptido sintético y los diferentes intentos fallidos de purificación, se decidió purificar CI2-E6*I en condiciones desnaturalizantes en una columna de fase reversa, C8. Se utilizaron solventes orgánicos que posteriormente se eliminaron por liofilización y se resuspendió en las mismas condiciones de guardado que el péptido sintético (Figura 15).

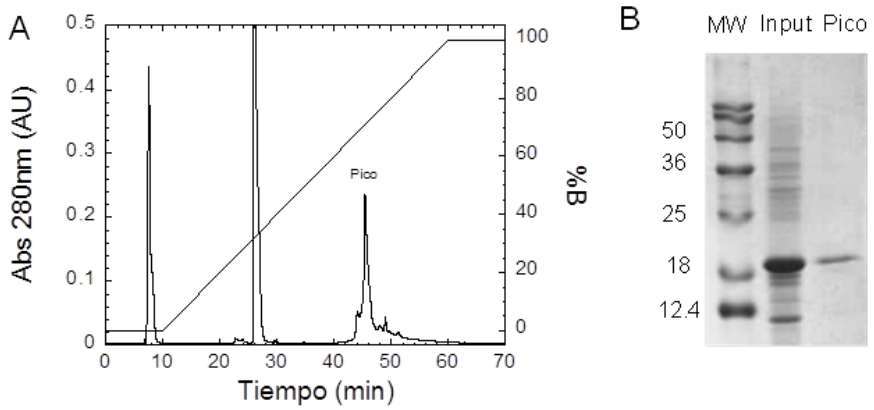


Figura 15. Purificación de CI2-E6*I en columna de fase reversa C8. (A), Cromatograma que muestra el perfil de elución de CI2-E6*I en 6.0M Gdm.Cl en columna C8. El pico eluye entre 46 y 48% de B. **(B),** Gel SDS-PAGE de purificación en columna C8. **Input**: muestra sembrada en la columna; **pico**: fracción tomada en el máximo de absorbancia del pico correspondiente a CI2-E6*I; **MW**: marcadores de peso molecular que se indican en KDa.

Finalmente, se realizaron numerosos intentos de digestión con la enzima trombina para separar la proteína CI2 de E6*I variando las condiciones de corte, sin obtener separación sustancial de las dos moléculas (no mostrado). Una posible razón para este

resultado podría ser que debido a la oligomerización de CI2-E6*I, el sitio de corte quede inaccesible para la enzima. En este sentido, se realizaron digestiones en presencia de concentraciones de desnaturalizante donde la trombina posee actividad y aún así no se observó separación. Es posible que la cantidad de desnaturalizante utilizado no sea suficiente para hacer accesible el sitio de corte; otra explicación probable es que el espacio presente en la construcción entre ambas proteínas y el sitio de la trombina no sea suficiente para un corte óptimo de la proteasa.

El interés de producir E6*I en el laboratorio radicó principalmente en la posibilidad de generar diferentes mutantes que permitieran responder preguntas formuladas a lo largo del trabajo. De este modo, sobre esta construcción se realizaron las siguientes mutantes que se expresaron y purificaron como se realizó con el péptido salvaje (ver Materiales y Métodos): E6*I C23S, E6*I C37S y C40S (E6*ICxxC) y E6*I C23S (E6*IC23S), C37S y C40S (E6*ISinC). La ausencia de cisteínas en la proteína CI2 nos permite utilizar estas proteínas sin la necesidad de separarlas de su fusión, soslayando la dificultad descripta previamente.

Los intentos de producir E6*I de forma recombinante mostraron que esta secuencia peptídica genera la agregación de proteínas altamente solubles como es el caso de CI2. Esta evidencia, junto con todos los resultados presentados a lo largo de este capítulo, sugieren que E6*I es el dominio que podría dirigir la oligomerización observada para la proteína E6 entera, proceso que puede tener un rol funcional en estas proteínas.

I.6. DISCUSIÓN.

En conjunto, los estudios presentados en este capítulo representan el primer aporte al conocimiento de los mecanismos básicos de plegamiento y de las propiedades en solución de E6*I, polipéptido al que se le atribuyen múltiples efectos en el contexto celular pero del que se desconocen aspectos fundamentales bioquímicos y estructurales. Pese a interrumpir un motivo independiente de plegamiento, mostramos por primera vez que este péptido compuesto por 50 residuos adopta distintas estructuras en solución dependiendo del entorno. Esto provee la base para comprender su mecanismo de acción frente a los blancos celulares.

Es importante destacar que una parte importante de esta tesis consistió en encontrar condiciones óptimas de replegado para realizar experimentos con este pequeño

pero complejo polipéptido; la alta tendencia a la precipitación observada para E6*I dificultaban la obtención de cantidades suficientes de muestra para su posterior caracterización mediante técnicas espectroscópicas.

E6*I, tal como se obtuvo de la síntesis, se disolvió inicialmente en Gdm.Cl y DTT. Una vez solubilizado a pH 5.0, el péptido se repliega formando un oligómero con características de estructura secundaria tipo lámina-β, a juzgar por su espectro de DC en el UV lejano. Estos oligómeros solubles de E6*$I_{pH\ 5.0}$ unen tioflavina T, reactivo que se une específicamente a estructuras β-repetitivas y es utilizado como sonda reportera de estructuras amiloideas (*120*). Finalmente, mediante AFM confirmamos la naturaleza amiloide de las estructuras de alto peso molecular presentes en E6*$I_{pH\ 5.0}$.

Actualmente es ampliamente aceptado que la mayoría de las proteínas pueden formar estructuras tipo amiloides dadas las condiciones apropiadas, que incluyen modificaciones en los parámetros químicos y físicos del entorno (*122*). Sin embargo, algunas proteínas muestran una tendencia más fuerte para formar estas estructuras que otras, basada en su secuencia y composición de aminoácidos (*123, 124*). El proceso de formación de amiloides está relacionado con un amplio número de patologías humanas; más de 20 proteínas solubles están involucradas en amiloidosis conocidas, y se cree que existen muchas enfermedades asociadas con el plegamiento incorrecto de proteínas que aún no han sido identificadas como tales (*125*). Por el contrario, se han obtenido fibras amiloides *in vitro* tanto a partir de proteínas y péptidos asociados a enfermedades, como de no relacionados a enfermedades amiloidogénicas, y a pesar de tener diferentes topologías y características de plegado en su forma nativa, sus formas agregadas tienen muchas propiedades en común (*125, 126*). El reciente trabajo que muestra la formación de amiloides funcionales por parte de la proteína Pmel17 apoya la hipótesis de que el "amiloide" es un tipo de plegamiento cuaternario que evolucionó en proteínas pertenecientes a diferentes organismos, desde las bacterias a los seres humanos, y que no es exclusivo de enfermedades vinculadas a mal plegamiento o situaciones patológicas (*127*). Como se mencionó anteriormente, la formación de estas estructuras también fue reportada para varias proteínas de HPV (*49, 116, 117*). Además, las proteínas E6 de los tipos virales HPV16 y 18 se auto-ensamblan *in vitro* en oligómeros solubles muy estables (E6SOs) y con alto contenido de hélice-α, que también fueron detectados *in vivo* en líneas celulares naturalmente transformadas por HPV (*75*). Posteriormente, otros grupos demostraron que E6 provenientes de grupos filogenéticos distintos se auto-ensamblan formando oligómeros y multímeros tanto *in vitro* como *in vivo (84).* La conservación de

esta propiedad dentro de la familia de proteínas de E6 sugiere que este mecanismo puede tener un rol funcional. Aunque no podemos explicar en esta instancia las bases estructurales de la diferencia observada entre las especies E6SOs y E6*I $_{pH\ 5.0}$, la fuerte tendencia de E6*I a la oligomerización nos permite sugerir a este péptido como la secuencia responsable de la oligomerización de la proteína E6 entera.

A pH 7.5, E6*I también forma estructuras de alto peso molecular pero con características de estructura tipo hélice-α, sin afinidad por la sonda tioflavina T y con tendencia a progresar lentamente en precipitados insolubles. Estas características son comparables a las observadas con los E6SOs de las proteínas E6 HPV16 y HPV18 obtenidos en el laboratorio. La especie E6*I $_{pH\ 7.5}$ es marginalmente estable, dado que bajas concentraciones de Gdm.Cl no le permiten adoptar la estructura secundaria tipo hélice alfa característica. En un contexto celular, esta estructura puede ser estabilizada por interacción con otras proteínas celulares o virales. De hecho, en bibliografía se han reportado eventos de hetero-oligomerización de E6*I con la proteína E6 entera (*94, 105*); además se demostró que las proteínas E6 y E6*I interactúan con el regulador transcripcional E2 a través de su N-terminal, específicamente por los residuos 28-31 presentes en ambas proteínas, representando otro ejemplo de hetero-oligomerización con una proteína viral (*128*).

A diferencia de los oligómeros-β obtenidos a pH 5.0, la presencia de Zn en la solución de replegado previene completamente la formación de estos oligómeros-α, dando lugar a una especie de tamaño pequeño y definido sin elementos de estructura secundaria canónica pero con un espectro de DC en el UV lejano con características únicas que indica cierto grado de estructuración. Este resultado es importante considerando la relevancia que tiene el Zn en el plegamiento de la proteína E6 entera con la que E6*I comparte secuencia. Además, constituye la primera evidencia de unión a Zn por parte de este producto de procesamiento alternativo que contiene sólo la mitad de un motivo de unión a Zn de la proteína entera. En el capítulo III se estudiarán las propiedades de unión a Zn de esta proteína evaluando el efecto que puede tener en su comportamiento conformacional.

Por otro lado, los resultados presentados en este capítulo que demuestran que E6*I se pliega en solución, junto con la evidencia emergente respecto a productos de procesamiento alternativo que interrumpen dominios independientes de plegamiento y aún así son funcionales como proteínas (*129*), constituyen datos que indican una alta tolerancia estructural de las proteínas en pos de ganancia de función.

Los resultados aquí descriptos muestran que E6*I posee una marcada plasticidad conformacional que depende de las condiciones del entorno como el pH o la presencia de Zn, siendo capaz de adoptar conformaciones estructuralmente no relacionadas entre ellas que incluyen estados con baja cantidad de estructura secundaria canónica y estabilidad marginal, conformaciones amiloidogénicas y diferentes especies oligómericas unas con contenido de hélice-α y otras con lámina-β (*130*). En este contexto, es posible considerar a E6*I como una secuencia camaleón.

El pH es una variable importante en el entorno intracelular, que se mantiene en un rango estrecho y definido de valores gracias a distintos sistemas *buffer*. Sin embargo, dependiendo de la localización sub-celular, la organela o el estado fisiológico de la célula, el pH puede variar considerablemente. Por ejemplo, el epitelio, tejido en el cual tiene tropismo el HPV, según se estratifica se acidifica alejándose del considerado basal que ronda en valores cercanos a pH 7.0 (*131*). Este ejemplo indica la posibilidad de que ambas especies de E6*I existan en un contexto celular, e inclusive es posible imaginarlo como un mecanismo de regulación del efecto generado por esta proteína.

La ausencia de consenso mencionada previamente respecto al sitio de inicio de la traducción de E6 de la cepa HPV16 nos llevó a estudiar comparativamente las dos secuencias primarias probables para E6*I HPV16. Los resultados obtenidos muestran que, excepto por diferencias vinculadas a la falta de 6 aminoácidos que modifican radicalmente el pI de los péptidos, ambas especies se comportan de manera similar respecto de las propiedades evaluadas en este capítulo. Las principales características estás asociadas a su capacidad de oligomerizar para conservar la estructura secundaria tipo hélice-α y al comportamiento frente al Zn; el agregado del metal modifica la estructura secundaria y cuaternaria de ambos polipéptidos, obteniendo el mismo espectro de dicroísmo circular independientemente de la metionina que se utilice como inicio de la traducción. En base a estas observaciones, todos los experimentos restantes de esta tesis se realizaron utilizando E6*$I_{1\text{-}50}$ como modelo de estudio.

Por último, el intento de expresar E6*I de forma recombinante puso en evidencia nuevamente la alta tendencia que tiene este péptido para precipitar, dirigiendo también la agregación insoluble de proteínas altamente solubles en un amplio rango de condiciones, como CI2. Estos experimentos se encuentran en línea con la hipótesis de Liu et al donde proponen al dominio N-terminal de E6, porción que contiene la secuencia de E6*I, como el responsable de la inestabilidad que origina la agregación insoluble de la proteína entera

así como de otras proteínas a las que se encuentre unida (*82*). En nuestro trabajo, acotamos a los aminoácidos contenidos en la secuencia de E6*I.

Los resultados obtenidos de la caracterización realizada en el presente capítulo pueden resumirse en el siguiente esquema que representa las diferentes conformaciones accesibles a E6*I *in vitro*:

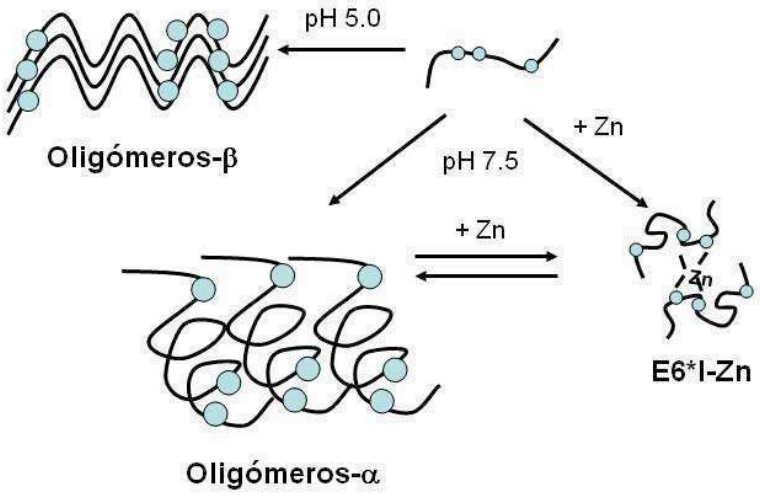


Figura 16. Esquema que resume el conjunto de conformaciones observadas para E6*I.. Se observan oligómeros en equilibrio con estructuras de bajo peso molecular, y el pH y la disponibilidad de Zn son dos variables que pueden modular los equilibrios observados.

Una vez sintetizada, E6*I podría plegarse para formar estructuras de alto peso molecular con características de estructura tipo hélice-α. Por un lado, estos oligómeros pueden estar en equilibrio con estructuras de bajo peso molecular que unen Zn y este equilibrio estará regulado por la disponibilidad del metal en la célula; por otro lado, el equilibrio se puede dar con otras especies no caracterizadas en este capítulo que aporten espectros funcionales diferentes a E6*I. De este modo, los oligómeros-α actuarían como una reserva de proteína. El hecho de ser marginalmente estables, permite imaginar a estas estructuras en equilibrio con múltiples conformaciones. A su vez, dependiendo de las condiciones del micro-entorno, E6*I podría formar las estructuras con características amiloides (oligómeros-β).

CAPÍTULO II:

Disección de E6*I: Análisis conformacional de la porción C-terminal de E6*I, E6*I_{29-53}

En el capítulo I se mostraron las tendencias conformacionales de E6*I del tipo viral HPV16, donde se observó una alta plasticidad dependiendo de las condiciones de entorno como el pH o la presencia de Zn. Con el objetivo de evaluar las preferencias estructurales de este péptido y definir las regiones involucradas en las distintas conformaciones observadas, inicialmente se utilizaron diferentes algoritmos predictores de estructura secundaria. La aplicación de estos algoritmos puede ser útil para identificar regiones de la cadena polipeptídica que tienen alta propensión a formar estructura secundaria bajo ciertas condiciones, como cambios en el pH o presencia de solventes como el TFE.

Se utilizó el meta-servidor MeDor (*MEtaserver of DisORder*) que permite realizar un análisis rápido y simultáneo de la secuencia de interés utilizando múltiples predictores en un único programa; además de identificar rápidamente regiones desordenadas, MeDor también puede ser utilizado para inferir información respecto de elementos de estructura secundaria presentes en la secuencia analizada (*132*) y por este motivo se utilizó este servidor con E6*I. Por otro lado se aplicó el algoritmo AGADIR, que calcula la propensidad local de una secuencia peptídica a la formación de estructura tipo hélice-α (*133*).

En la Figura 1A se observa que de acuerdo al método elegido, los residuos que se predicen que forman elementos de estructura secundaria canónica, y particularmente hélice-α, se encuentran en la porción C-terminal de E6*I. Por otra parte, MeDor predice regiones de desorden en el extremo N-terminal de E6*I. Los datos coinciden con los obtenidos por AGADIR (Figura 1B), indicando que la tendencia a formar hélice está localizada en el extremo C-terminal del péptido. Los residuos que ambos algoritmos sugieren como parte de este tipo de estructura no son exactamente los mismos; MeDor predice la hélice desplazada levemente hacia el extremo N-terminal de la molécula, aunque aún dentro de la porción C-terminal de E6*I, como lo hace AGADIR. Interesantemente, esta porción del péptido contiene las cisteínas correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn del dominio N-terminal de la proteína E6 entera. Como se mencionó previamente, en el capítulo I mostramos que este metal modifica sustancialmente las propiedades conformacionales de E6*I influyendo tanto sobre la estructura secundaria como sobre la estructura cuaternaria. En este contexto, podemos hipotetizar que la tendencia a formar hélice de la porción C-terminal de E6*I también se vea afectada por la presencia del metal.

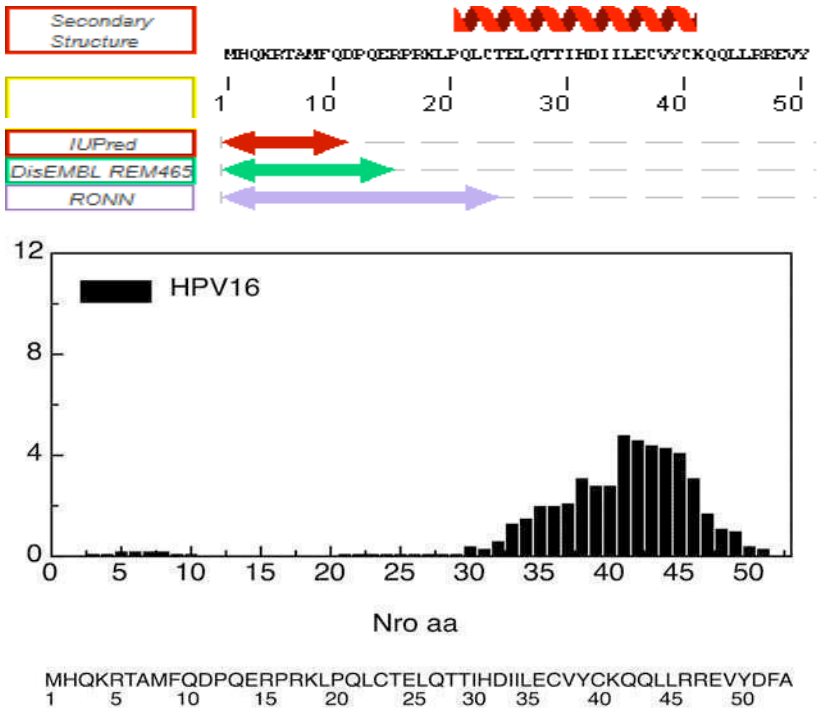


Figura 1. Algoritmos predictores de estructura secundaria. Se utilizó la secuencia de E6*I HPV16 y los predictores **Arriba:** Medor. La hélice roja corresponde a la predicción de estructura secundaria. Los otros tres predictores corresponden a algoritmos para regiones desordenadas. **Abajo:** AGADIR. Debajo se indica la secuencia de aminoácidos de E6*I HPV16.

II. PORCIÓN C-TERMINAL DE E6*I: E6*I_{29-53}.

Considerando los resultados obtenidos con los predictores de estructura secundaria, se sintetizó un péptido correspondiente al extremo C-terminal de E6*I (E6*I_{29-53}), que contiene la región que se predice con mayor tendencia a formar elementos de estructura tipo hélice alfa. La secuencia sintetizada de E6*I_{29-53} es:

TIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFA

El peso molecular teórico es 3069.5 Da, determinado utilizando el programa Protparam y confirmado por espectrometría de masas MALDI-TOF; su punto isoeléctrico (pI) teórico es de 5.4. El objetivo inicial consistió en comparar las propiedades conformacionales de E6*I_{29-53} con aquellas observadas para E6*I en las mismas condiciones de entorno.

II.1. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE E6*I_{29-53} EN SOLUCIÓN.

Al igual que con E6*I, se partió de una solución de E6*I_{29-53} en 6.0M Gdm.Cl y se diluyó en una solución de *buffer* Tris-HCl pH 7.5 y reductor. El espectro de DC en el UV lejano de E6*I_{29-53} obtenido a pH 7.5 tiene las características de un péptido desordenado, carente de estructura secundaria canónica, con un mínimo < 205 nm y una banda negativa alrededor de 220 nm (Figura 2A); debido a la presencia de Gdm.Cl residual no es posible obtener información de longitudes de onda menores en el espectro. La dilución del péptido en presencia de Zn modifica sutilmente la estructura secundaria adquirida, generando un espectro con un hombro positivo a aproximadamente 217 nm y uno negativo alrededor de 224 nm (Figura 2A); este espectro coincide con las características del espectro observado para la especie de E6*$I_{pH\ 7.5}$ con Zn. La banda positiva a ~218 nm sugiere la existencia de estructura secundaria tipo poli-prolina (PII) en esta especie del péptido (*134*).

El hecho de que el agregado de metal genere en E6*I y E6*I_{29-53} un espectro de DC similar indica que la estructura estabilizada estaría localizada en la porción C-terminal de E6*I, E6*I_{29-53}. Esto es consistente con la presencia en E6*I_{29-53} de las cisteínas 37 y 40 que constituyen la mitad del motivo de unión a Zn en la proteína E6 entera, como se describió anteriormente. A su vez, la similitud de ambos espectros a nivel cualitativo sugiere que el efecto del Zn es local y restringido a los últimos 25 aminoácidos de E6*I, dado que E6*I_{29-53} carece de los primeros 25 residuos.

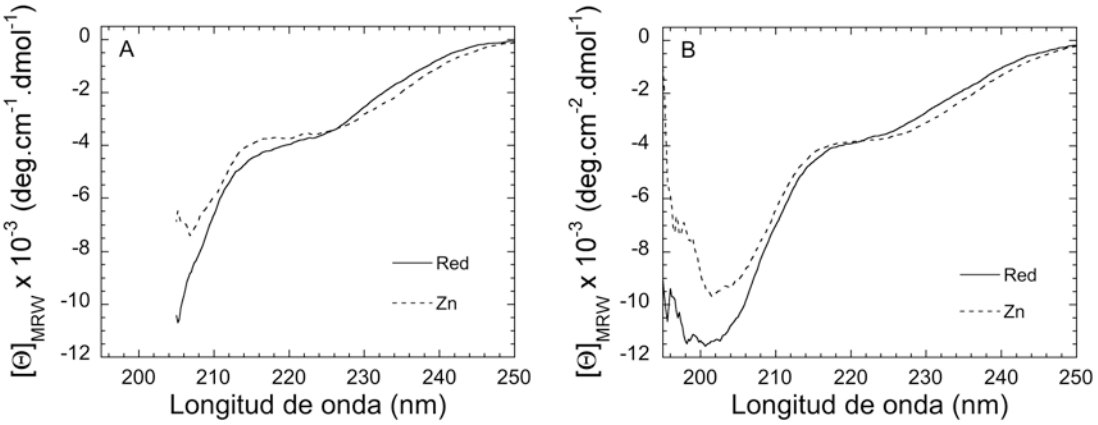


Figura 2. Estructura secundaria de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$. Espectros de DC en el UV lejano de **(A)** E6*I_{29-53} obtenido por dilución (0.6M Gdm.Cl) en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en presencia (Zn-línea punteada) o ausencia de Zn (Red-línea continua). Los espectros son medidos hasta 205 nm debido a la presencia de Gdm.Cl residual que perturba la medición. **(B)** E6*I_{29-53} obtenido por diálisis (0M Gdm.Cl) en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en presencia (Zn-línea punteada) o ausencia de Zn (Red-línea continua). Todas las condiciones contienen TCEP como agente reductor.

De acuerdo a lo realizado con E6*I, fue de interés evaluar el efecto del Gdm.Cl residual en la inducción de estructura secundaria. Con este objetivo, el péptido E6*I_{29-53} se dializó para quitar el Gdm.Cl remanente. Los espectros de las especies de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ en 0.6M Gdm.Cl son comparables a los obtenidos en ausencia del desnaturalizante (Figura 2A vs 2B). En este caso y a diferencia de lo que ocurre con E6*I (Capítulo I, Figura 11A), bajas concentraciones de Gdm.Cl no afectan la estructura secundaria adquirida.

A partir de estos experimentos es posible concluir que si bien el Zn afecta de igual manera a los péptidos E6*I y E6*I_{29-53}, las propiedades conformacionales de E6*I son más complejas y en parte se encuentran mediadas por los primeros 25 aminoácidos de la molécula. Un ejemplo que justifica esta observación es la marcada diferencia observada en el tipo y la cantidad de estructura secundaria obtenida por ambos péptidos en ausencia de desnaturalizante. E6*I_{29-53} no puede adoptar espontáneamente elementos de estructura secundaria canónicos en solución como lo hace E6*I, donde se observan oligómeros con un alto contenido de estructura hélice-α.

*II.1.1 Tendencias conformacionales de E6*I_{29-53} a pH 7.5.*

El espectro de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ con Zn es distinto al obtenido en ausencia del metal, aunque la diferencia es sutil. Esto sugiere la existencia de algún tipo de estructura secundaria que se modifica por el agregado de Zn y en este escenario nos propusimos investigar con mayor detalle el grado de estructuración de este pequeño péptido. Una forma directa que permite analizar estos cambios conformacionales es comparar el espectro de DC en el UV lejano de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ en ausencia o presencia de altas concentraciones de desnaturalizante.

En la Figura 3 se muestra que el espectro de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ sin Zn en bajas concentraciones de Gdm.Cl difiere claramente del obtenido en 6.0M Gdm.Cl. Se pierde la banda negativa a 220 nm y se observa ahora una banda positiva alrededor de 230 nm, que sugiere la presencia, en estas condiciones, de un *turn*.

Por otro lado, el espectro de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ con Zn también se modifica en presencia de altas concentraciones de Gdm.Cl (Figura 3); desaparecen el hombro positivo a ~217 nm y el negativo alrededor de 224 nm característicos de la especie en ausencia de Gdm.Cl, indicando una pérdida de estructura secundaria.

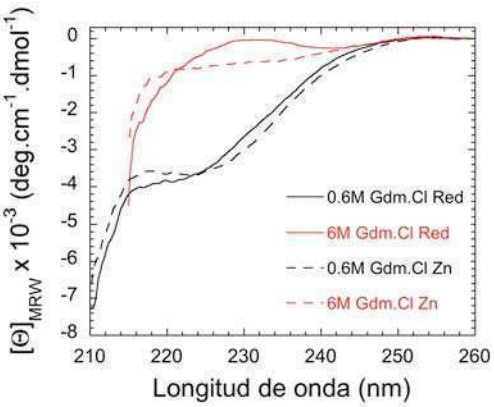


Figura 3. Cambios estructurales en E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ inducidos por el Gdm.Cl. Espectros de E6*$I_{29\text{-}53}$ en ausencia de Zn (Red-línea entera) y en presencia de Zn (Zn-línea partida), en 0.6 (líneas negras) y 6.0M (líneas rojas) Gdm.Cl. Todas las condiciones contienen TCEP como reductor.

Es importante destacar que los espectros en 6.0M Gdm.Cl de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con y sin Zn son distintos. Esta diferencia podría explicarse considerando que aunque mucha de la estructura secundaria se pierde por el agente desnaturalizante, el Zn permanece unido al péptido estabilizando algún tipo de estructura local distinta del *turn* observado para la especie reducida. Este experimento además sugiere que la estructura secundaria presente en E6*$I_{29\text{-}53}$ en ausencia de desnaturalizante es independiente de la coordinación de metal, dado que en la especie sin metal también hay pérdida de estructura secundaria generada por el desnaturalizante.

En conjunto, estos resultados indican la presencia de cierto grado de estructuración en E6*$I_{29\text{-}53}$ cuyo espectro de DC es el de un péptido aparentemente desordenado. Aún en 6.0M Gdm.Cl, ambas especies conservan algún tipo de estructura local. La falta de superposición de los espectros de DC de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con y sin Zn en 6.0M Gdm.Cl, nos permite inferir que el metal permanece unido en esta condición.

Por último, este experimento constituye una evidencia más respecto de que espectros de DC no canónicos no implican un estado extendido desestructurado; existen estructuras locales, muy dinámicas, que actúan como núcleos de plegamiento.

II.2. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE E6*$I_{29\text{-}53,\ PH\ 7.5}$ EN SOLUCIÓN.

La formación de oligómeros solubles es una característica observada para las proteínas E6*I y E6 entera. En este contexto, fue de interés evaluar la estructura cuaternaria de E6*$I_{29\text{-}53}$. Con este fin, se analizo el radio hidrodinámico de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ por filtración en tamiz molecular utilizando una matriz Superdex 75. Al igual que para

E6*$I_{pH\ 7.5}$, la columna se equilibró con 50mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5 y 0.2M Gdm.Cl que se agregó para evitar interacciones con la matriz de la columna.

La Figura 4A muestra que E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$, luego de diluirlo, eluye como una molécula de tamaño pequeño y definido tanto en ausencia como en presencia de metal. Se obtiene una especie que eluye a los 17.7ml, correspondiendo a una proteína globular de 6.1KDa. Por otro lado, cuando la muestra de E6*$I_{29\text{-}53}$ se obtiene por diálisis, en ausencia de Gdm.Cl, también se observa una especie de tamaño pequeño y definido que eluye a los 17.9ml, correspondiendo a una proteína globular de 5.7KDa (Figura 4B). En este último caso, el pico correspondiente a la especie reducida no es homogéneo indicando un posible equilibrio con una especie de un tamaño mayor al del pico mayoritario.

El radio hidrodinámico obtenido en ambas condiciones es compatible con la formación de un dímero o un monómero extendido, no pudiendo diferenciar por esta técnica analítica cual es la especie presente en la solución. Por último, cabe destacar que los cambios en la estructura secundaria estabilizada por el metal no se traducen en modificaciones del radio hidrodinámico de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$.

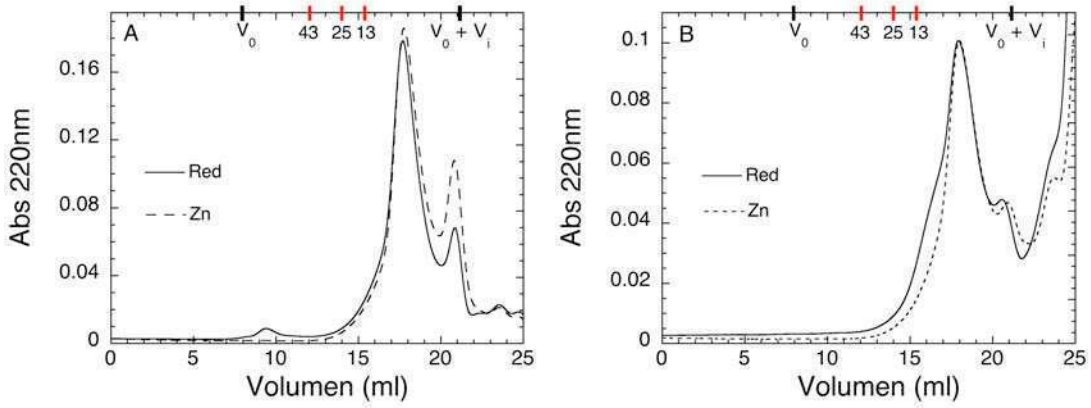


Figura 4. Estructura cuaternaria de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$. Perfil de elución en columna Superdex 75 de **(A)** E6*$I_{29\text{-}53}$ obtenido por dilución (0.6M Gdm.Cl) en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en presencia (Zn-línea punteada) o ausencia de Zn (Red-línea continua). **(B)** E6*$I_{29\text{-}53}$ obtenido por diálisis (0M Gdm.Cl) en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en presencia (Zn-línea punteada) o ausencia de Zn (Red-línea continua). Todas las condiciones contienen TCEP como agente reductor.

Los resultados obtenidos indican que E6*$I_{29\text{-}53}$ no forma estructuras de alto peso molecular; además, la presencia de Zn en este péptido, no produce cambios en su radio hidrodinámico. Esto difiere del comportamiento observado para E6*I donde la especie reducida forma oligómeros-α solubles y la unión al Zn impide la oligomerización, dando

lugar a una especie de tamaño pequeño y definido, carente de estructura hélice-α (Capítulo I, (*130*)).

Finalmente, este hecho sugiere que los primeros 25 aminoácidos de E6*I son fundamentales para las propiedades de oligomerización de la molécula E6*I entera.

II. 3. ESTABILIZADORES DE ESTRUCTURA SECUNDARIA.

A diferencia de las proteínas globulares que poseen estructuras secundarias y terciarias consolidadas, los péptidos pequeños suelen mostrar un contenido marginal de estructura, o diversos equilibrios de estructuras nacientes. Esta estructura en general es secundaria, con bajo número de interacciones a largo alcance y estabilizada localmente. Es ampliamente conocido el efecto estabilizador de estructuras secundarias canónicas de determinados solventes orgánicos como el TFE y detergentes como el SDS (*135*). E6*I_{29-53} es un péptido pequeño, con estructuras dinámicas estabilizadas localmente y constituye un modelo ideal para estudiar tendencias conformacionales mediante la estabilización con los aditivos antes mencionados.

Los algoritmos aplicados a E6*I predicen que el péptido E6*I_{29-53} posee una clara tendencia a adquirir estructura del tipo hélice alfa. La estabilidad de esta estructura sería marginal y en principio, como se describió previamente, no se observa en el espectro de DC obtenido (Figura 2). Dado que esta probable hélice contiene las cisteínas CxxC correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn, también resulta importante establecer el efecto del metal en la estabilización de hélice y con ello establecer su posible rol estructural.

*II.3.1. Efecto del Trifluoroetanol sobre E6*I_{29-53}.*

Con el objetivo de analizar la existencia de regiones con tendencia a formar estructura secundaria del tipo hélice alfa, tal como sugiere el algoritmo AGADIR, se midió el espectro de DC en el UV lejano del péptido E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ en concentraciones crecientes del solvente 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE). Dado que nos interesa determinar el efecto del metal en la inducción de estructura secundaria canónica, el experimento se realizó en ausencia y presencia de Zn.

Como se observa en las Figuras 5A y B, correspondientes a los espectros de las titulaciones de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ con o sin Zn, a medida que aumenta el porcentaje de TFE utilizado se incrementan el mínimo a 208 nm y la banda negativa a 222 nm, señales características de hélice-α.

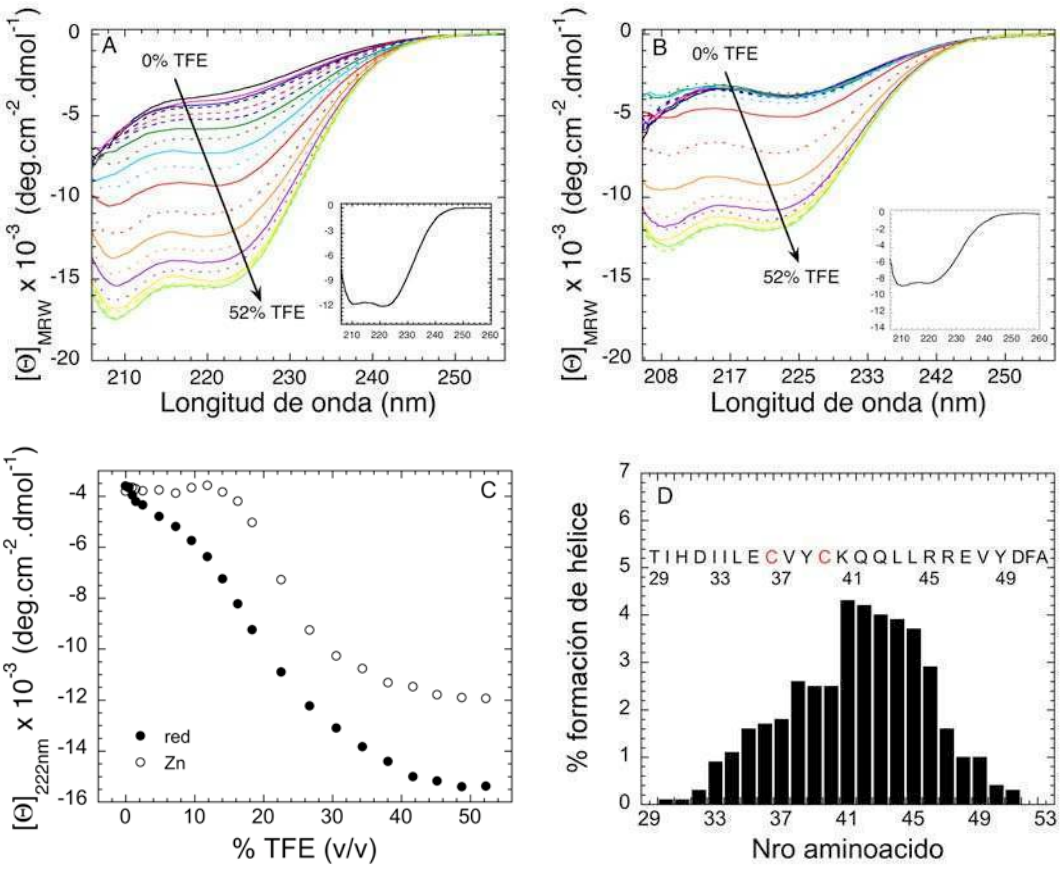


Figura 5. Efecto del TFE en la estructura secundaria de E6*I$_{29-53,\ pH\ 7.5}$. **(A)** Espectros de DC en el UV lejano de la titulación con TFE de E6*I$_{29-53,\ pH\ 7.5}$ en ausencia de Zn. **Inserto**: espectro diferencia entre el espectro de la máxima cantidad de TFE alcanzada y el espectro en ausencia de TFE. **(B)** Espectros de DC en el UV lejano de la titulación con TFE de E6*I$_{29-53,\ pH\ 7.5}$ en presencia de Zn. **Inserto:** espectro diferencia entre el espectro de la máxima cantidad de TFE alcanzada y el espectro en ausencia de TFE. **(C)** Gráfico de elipticidad molar a 222 nm en función del % TFE (v/v) agregado. Los círculos llenos corresponden a la muestra en ausencia de Zn (Red) y los vacios corresponden a la muestra en presencia de Zn (Zn). **(D)** AGADIR de E6*I$_{29-53,\ pH\ 7.5}$. Sobre las barras está indicada la secuencia de E6*I$_{29-53}$, donde cada barra corresponde al % de formación de hélice del residuo que se encuentra sobre ella.

Al evaluar el gráfico de elipticidad molar a 222 nm ($[\Theta]_{222nm}$), indicativo de poblaciones en hélice-α, en función del porcentaje de TFE agregado a E6*I$_{29-53,\ pH\ 7.5}$ en ausencia de Zn (Figura 5C, círculo negro) se advierten tres regiones principales: una región inicial hasta aproximadamente 15% de TFE donde se observa un incremento gradual de la señal con el aumento de TFE, correspondiente a la inducción de estructura tipo hélice-α. La siguiente región comprende el rango entre 15 y 40% TFE, y es en este rango donde ocurre la mayor inducción de estructura helicoidal en E6*I$_{29-53,\ pH\ 7.5}$. Finalmente, en altas concentraciones de TFE se observa una meseta correspondiente a la máxima cantidad de hélice obtenida. Cabe destacar que en estas condiciones la inducción de estructura secundaria tipo hélice-α suele observarse con cualquier péptido

que se evalúe, independientemente de si tienen o no la tendencia a formar este tipo de estructura.

La curva de titulación con TFE de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ en presencia de Zn (Figura 5C, círculo vacio) es muy diferente a la observada para el péptido sin metal; en este caso no hay estabilización de estructura tipo hélice-α en bajas concentraciones de TFE y el incremento en elipticidad molar se observa sólo después del agregado de 15% v/v de TFE. Claramente, el Zn impide la estabilización de elementos de estructura hélice-α, sugiriendo que la región del CxxC contiene parte de los residuos involucrados en la formación de la hélice. Mayores concentraciones de TFE generan un incremento en la señal a 222 nm, indicativo de la estabilización de estructura hélice-α también en la especie con Zn. En este caso, los residuos que constituyen la hélice no participarían de la unión al metal. En 52% de TFE se estabilizó la máxima proporción de hélice-α en ambas especies de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ (Figura 5 A y B, inserto).

En base a estos datos es posible suponer que existen al menos dos regiones de la molécula con tendencia a formar hélice alfa. Estas regiones tienen distinta propensión a adoptar este tipo de estructura; la primera solo se observa en la especie reducida y ocurre a bajas concentraciones de TFE (hasta 15%) y la segunda región, presente en las dos especies, se estructura a concentraciones mayores. En la curva de titulación con TFE de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ sin metal existirían más de dos estados, coincidiendo con las dos regiones observadas, mientras que para la especie con Zn es posible ajustar a un modelo de dos estados que considera un equilibrio entre conformaciones desordenas y hélice alfa y calcular la energía libre de la segunda transición.

El valor de elipticidad molar a 222 nm obtenido para E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con metal como función de la concentración de TFE se ajustó a la ecuación:

$$[\Theta]=[\Theta^{TFE}_{222}]+[\Theta^{H2O}_{222}]e^{(1/RT(m[TFE]/[H2O]-\Delta G_{H2O}))} / (1+e^{(1/RT(m[TFE]/[H2O]-\Delta G_{H2O}))})$$

que sale del modelo de unión de TFE a un polipéptido (*136*). Este modelo de dos estados permite calcular el ΔG de la formación de la hélice y el porcentaje de hélice-α en agua y TFE; el valor *m* del ajuste describe la efectividad del solvente en la transición entre los dos estados (*137*) en términos de exposición al solvente (*138*). El análisis sobre los datos de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con Zn reportó una energía libre de formación de hélice en agua de 3.7 ± 0.3 kcal·mol^{-1}. La cantidad de hélice preexistente en las especies de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con y sin Zn, corresponde a una estructura de ínter conversión dinámica que involucra de 2 a 3 residuos de extensión (Tabla I).

Cuando se evalúa el porcentaje de hélice obtenido al 15% TFE, correspondiente a la primera región con mayor tendencia a formar esta estructura, se observa que en E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ en ausencia de metal hay un 20.6% de hélice estabilizada, equivalente a 5 residuos en hélice para esta especie (Tabla I). Como mencionamos previamente, en la especie de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ con Zn, no hay estabilización de residuos en esta estructura.

A diferencia de la hélice-α presente en agua, la hélice estabilizada en 50% TFE representa una estructura más consolidada y el porcentaje de hélice calculado proviene de un mayor número de residuos en dicha conformación (*139*). A 50% TFE, el péptido en su estado reducido presenta un 43.6% de hélice-α, lo que se corresponde con aproximadamente 11 residuos conformando dicha estructura (Tabla I). La presencia de Zn genera una disminución en el porcentaje de hélice observado a 33.9%, equivalente a 8.5 residuos (Tabla I). La diferencia entre los residuos estabilizados al final de la titulación en la especie reducida y la que tiene Zn es de 2.5, idéntica a la observada al 15% de TFE. Finalmente, las transiciones son independientes dado que se adicionan al estado final.

Tabla I. Porcentaje de residuos en estructura hélice-alfa en E6*I_{29-53} en presencia de TFE.

Péptido	% hélice en H_2O	$N_{\alpha,\ H2O}$	% hélice 15% TFE	$N_{\alpha,TFE}$ 15% v/v	% hélice en 50% TFE	$N_{\alpha,TFE}$ 50% v/v	AGADIR
E6*I_{29-53} Red	10.2%	2.6	20.6%	5.0	43.6%	11.0	16.0
E6*I_{29-53} Zn	10.8%	2.7	10.9%	2.7	33.9%	8.5	-[a]

Nα, números de residuos hélice alfa.

[a], no se calcula porque no se puede introducir en el algoritmo la variable Zn.

Los valores de % de hélice son calculados considerando la elipticidad molar a 222nm y aplicando una ecuación empírica detallada en Materiales y Métodos.

Los resultados experimentales avalan la predicción del algoritmo AGADIR que indica a la región de los residuos CxxC, correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn, con tendencia a adoptar estructura tipo hélice-α. El metal unido a E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ no permite que se propague la hélice en esa región, disminuyendo el número de residuos totales que se pueden obtener en esta conformación (Tabla I). La hélice en el estado final es la sumatoria de la hélice en la región donde se une el Zn más la hélice en una porción distinta del péptido, que se estabiliza en las dos especies. Por otro lado, al observar el gráfico de AGADIR donde se indica la tendencia de cada residuo de E6*I_{29-53} a formar hélice se distinguen dos regiones claras con diferente propensión

a formar esta estructura (Figura 5D). En este caso la región con mayor tendencia correspondería a los residuos 41 a 46 aproximadamente, y la otra región que involucra al CxxC tendría menor tendencia. En cambio, nuestros resultados experimentales sugieren que esto ocurre de manera inversa; la región con mayor propensión a formar hélice contendría alguno de los residuos responsables de la unión a Zn.

*II.3.2. Efecto del SDS sobre E6*I_{29-53}.*

Otro inductor de estructura secundaria muy utilizado para analizar las tendencias conformacionales en polipéptidos es el detergente sodio dodecil sulfato (SDS). El tipo y la cantidad de estructura inducida por este detergente dependen del potencial del péptido a formar hélice-α o lámina-β y de la concentración de detergente utilizada.

El efecto del SDS es menos predecible que el del TFE en cuanto al tipo de estructura estabilizada y esto dificulta la interpretación de los cambios conformacionales observados en las proteínas en presencia de soluciones con este detergente.

En general, a bajas relaciones molares de péptido/SDS (concentraciones debajo de la Concentración Micelar Crítica –CMC-) puede predominar una estructura tipo lámina-β si la secuencia tiene el potencial para formar esta estructura, aunque en exceso del surfactante (por arriba de la CMC) en general se interrumpe la hoja beta dando origen a una hélice-α, si el fragmento tiene la potencialidad para formarla. Péptidos sin ningún potencial para formar algún elemento de estructura secundaria permanecen desestructurados independientemente de la concentración de SDS (*140*).

En la Figura 6 se observan los espectros de dicroismo circular de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$, obtenidos en presencia de condiciones sub-micelares (Figura 6A) y micelares de SDS (Figura 6B).

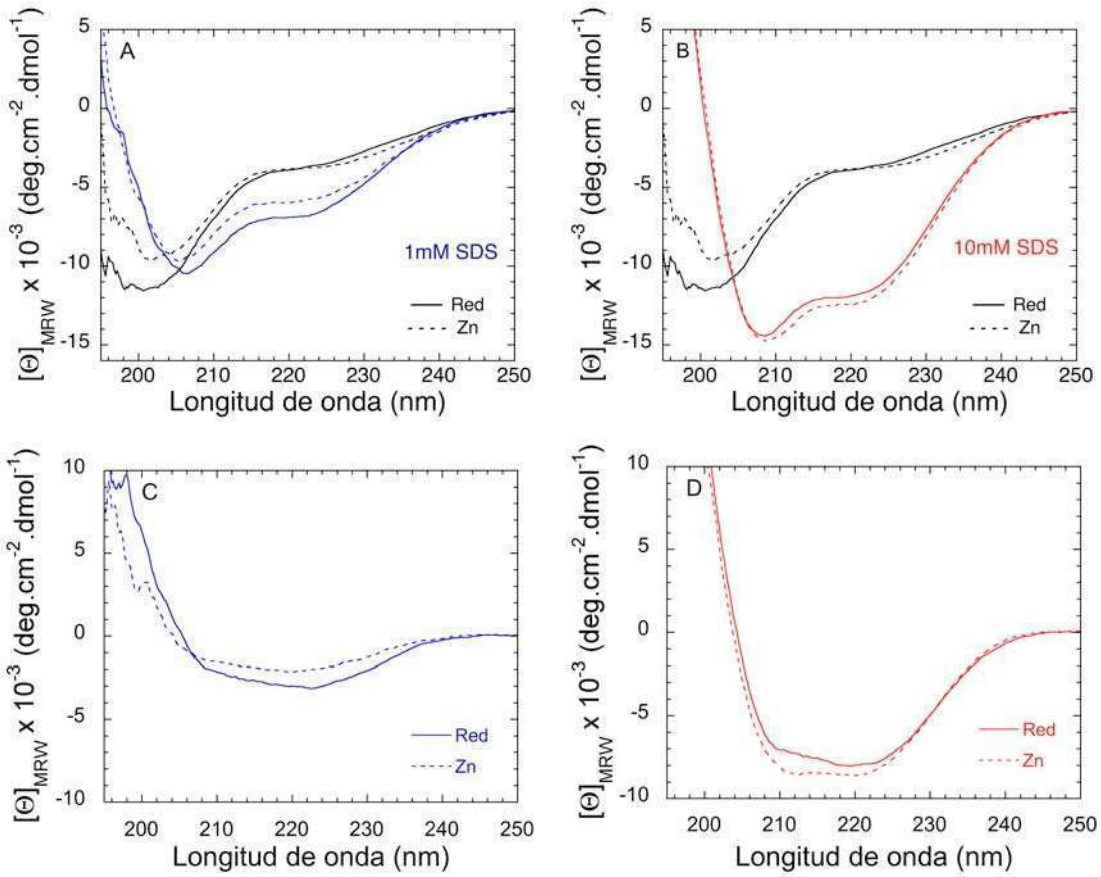


Figura 6. Efecto del SDS en la estructura secundaria de E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$. Espectros de DC en el UV lejano de E6*$I_{29\text{-}53}$ en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, TCEP **(A)** con concentración submicelar de SDS (1mM), **(B)** con concentración micelar de SDS (10mM). La línea continua corresponde a la especie sin Zn (Red) y la punteada a la especie con Zn (Zn). Se dializó el péptido para quitar el Gdm.Cl que interactúa con el SDS dando origen a un precipitado. **(C) Espectros diferencia:** espectro en 1mM SDS – espectro en ausencia de SDS para la especie sin Zn (Red-línea continua) y para la especie con Zn (Zn-línea punteada). **(D) Espectros diferencia:** espectro en 10mM SDS – espectro en ausencia de SDS para la especie sin Zn (Red-línea continua) y para la especie con Zn (Zn-línea punteada).

La adición de concentraciones sub-micelares de SDS (1mM SDS) sobre E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ induce modificaciones en la estructura del péptido obteniendo un espectro con un mínimo a 206 nm y otro a 222 nm, menos pronunciado, que indican la presencia de estructura tipo hélice-α (Figura 6A).

La cantidad de estructura estabilizada con 1mM SDS en E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con Zn es levemente menor a la estabilizada en ausencia de Zn (Figura 6A). Este resultado coincide con el observado en los experimentos de TFE, donde se obtuvo una tendencia diferencial a formar esta estructura dependiendo de la presencia de Zn. Los resultados aquí descriptos sugieren a la región del CxxC como un punto fuerte de nucleación de estructura secundaria en E6*$I_{29\text{-}53}$.

El cálculo del número de residuos en hélice considerando el valor de elipticidad molar a 222 nm para E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con y sin Zn en presencia de 1mM SDS indica la existencia de 4 y 5 residuos en esta estructura, respectivamente (Tabla II). Aunque la diferencia entre ambas especies es menor a la observada en los experimentos de TFE (2.7 y 5 residuos, respectivamente; ver Tabla I), la tendencia es la misma. Por otro lado, el SDS puede disminuir la afinidad del péptido por el Zn, dado que es un detergente iónico, y minimizar su efecto.

Cabe destacar que si bien el valor de elipticidad molar negativa a 222 nm está en relación directa con la cantidad de estructura secundaria y se usa como estimador cuantitativo de la cantidad de estructura hélice-α, interpretaciones en términos absolutos de este parámetro pueden llevar a conclusiones erróneas. Esto se debe a que algunos elementos de estructura secundaria, como la hélice tipo poli-prolina o los *turns*, poseen bandas con intensidades opuestas, resultando en la anulación mutua de las intensidades y en una sub-evaluación de la cantidad de estructura secundaria presente en la proteína (*114*).

En presencia de concentraciones micelares de SDS (10mM SDS) se observa un espectro con dos mínimos a 208 nm y 222 nm y un máximo alrededor de 195 nm, características claras de estructura hélice-α (Figura 6B); en estas condiciones se obtiene una mayor cantidad de residuos estabilizados en hélice-α a juzgar por la diferencia de elipticidad molar entre E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ con 10mM SDS y con 1mM SDS. Los residuos en hélice presentes en el estado final en 10mM SDS son 8 para la especie reducida y 8.6 para la especie con Zn (Tabla II). Los valores obtenidos no constituyen una diferencia significativa en la cantidad de estructura secundaria estabilizada por el SDS en presencia o ausencia de Zn (Figura 6B); esto sugiere que los aminoácidos que intervienen en esta estructuración no corresponderían a aquellos relacionados con la coordinación de metal. Otra posible explicación es que E6*$I_{29\text{-}53,\ pH\ 7.5}$ en presencia del detergente pierda el metal, obteniéndose entonces el mismo comportamiento en ambas condiciones.

Tabla II. Porcentaje de residuos en estructura hélice-alfa en E6*I_{29-53} en presencia de SDS.

Péptido	% hélice H_2O	$N_{\alpha,\ H2O}$	% hélice 1mM SDS	$N_{\alpha,\ 1mM\ SDS}$	% hélice 10mM SDS	$N_{\alpha,10mM\ SDS}$
E6*I_{29-53} Red	10.6%	2.7	19.4%	5.0	33.0%	8.0
E6*I_{29-53} Zn	10.7%	2.7	16.5%	4.0	34.6%	8.6

Nα, números de residuos hélice alfa.

Los valores de % de hélice son calculados considerando la elipticidad molar a 222nm y aplicando una ecuación empírica detallada en Materiales y Métodos.

En conjunto, los resultados aquí descriptos indican que E6*I_{29-53}, en las condiciones evaluadas, tiene tendencia a formar estructura secundaria tipo hélice-α y esta tendencia es modulada por el Zn. Como mencionamos previamente, los resultados se encuentran en concordancia con los obtenidos en los experimentos con TFE. Las dos regiones principales observadas en las titulaciones con TFE tienen su correlato con las dos condiciones de SDS utilizadas; el comportamiento en concentraciones sub-micelares se condice con la primera región de la curva de TFE donde la especie reducida tiene mayor tendencia a formar hélice y el Zn impide esta estructuración. La segunda transición se corresponde con los resultados analizados en concentraciones micelares del detergente, donde se obtiene una mayor estabilización de residuos en hélice aunque el número de residuos en 50% v/v de TFE (11.0 residuos para la especie sin Zn- Red-) es mayor al obtenido en 10mM SDS (8.0 residuos). En este caso se observó la misma estabilización de hélice en ambas especies (Tabla II), posiblemente por pérdida de Zn.

II. 4. ESTUDIO COMPARATIVO CON CEPAS PROTOTIPICAS DE HPV.

Posteriormente fue de interés analizar si este comportamiento conformacional, que involucra la estabilización de estructura tipo hélice alfa y un claro efecto del metal sobre esta estructura, era compartido por otras secuencias correspondientes a la porción C-terminal de E6*I (E6*I_{29-53}) de distintos tipos de HPV. Se utilizaron péptidos correspondientes al C-terminal de E6*I (denominados en adelante E6*Ic) de cuatro tipos virales prototípicos, que pertenecen a los tipos de HPV de mayor relevancia epidemiológica (*17, 141, 142*); HPV18, HPV31 y HPV16, que fue caracterizado previamente, son de alto riesgo (ver Introducción) mientras que HPV11 es de bajo riesgo.

La Figura 7 muestra un alineamiento de las cuatro secuencias sintetizadas:

```
HPV16       TIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFA 25
HPV31       PYDELRLNCVYCKGQLTETEVLDFA 25
HPV18       SLQDIEITCVYCKTVLELTEVFEFA 25
HPV11       SLHTLQIQCVFCRNALTTAEIYAYA 25
            . . : : **:*:  *   *:  :*
```

Figura 7. Alineamiento según el programa Clustal W de las secuencias aminoacídicas de los cuatro tipos virales prototípicos evaluados. En rojo se muestran los residuos no polares, en verde los polares, en azul los ácidos y en rosa los básicos. * indica los residuos idénticos; : indica sustituciones conservadas (propiedades bioquímicas) y . indica sustituciones semi-conservadas (tamaño).

Como puede observarse en esta figura, los cuatro péptidos comparten las cisteínas del motivo CxxC que se encuentran estrictamente conservadas en todos los tipos de HPV, y en particular se destaca una alta conservación de residuos en la región que rodea estas cisteínas (3 residuos de 6 totales conservados en los 4 tipos).

Se calculó la identidad de secuencia entre todos los pares posibles de los péptidos utilizados en esta sección y se indica en la siguiente tabla (Tabla III):

Cepa	HPV16	HPV31	HPV18	HPV11	Nombre	pI [a]
HPV16	ID	52.0%	48.0%	32.0%	E6*I$_{29-53}$	5.4
HPV31		ID	44.0%	32.0%	E6*Ic31	4.2
HPV18			ID	36.0%	E6*Ic18	3.9
HPV11				ID	E6*Ic11	6.5

[a] calculado a partir de las secuencias en el programa Protparam.

Tabla III. Identidad de secuencia entre los distintos péptidos utilizados.

El grupo de los cuatro péptidos genera 6 pares de alineamientos distintos con variaciones en la identidad de secuencia proteica desde 32.0% para los pares E6*Ic11/E6*I$_{29-53}$ y E6*Ic11/E6*Ic31 hasta 52.0% para el par E6*I$_{29-53}$/E6*Ic31 (Tabla III). De los 25 residuos presentes en las secuencias, sólo 6 son idénticos entre ellas; la variación de secuencia en el grupo de los cuatro péptidos E6*Ic homólogos es extensa. En la Tabla III también se indica el nombre con el que se identificarán los distintos péptidos en adelante y sus correspondientes pI teóricos.

Los péptidos obtenidos por síntesis química se purificaron mediante RP-HPLC, se liofilizaron y resuspendieron en 6.0M Gdm.Cl para realizar los experimentos que se mostraron anteriormente con E6*I_{29-53}.

II.4.1. Estructura secundaria adoptada por los diferentes péptidos en solución.

Una vez purificados, los tres péptidos se diluyeron a la condición de trabajo elegida para E6*I_{29-53} y se analizaron los diferentes espectros de DC obtenidos en presencia y ausencia de Zn.

En la Figura 8A se representan los espectros de DC en el UV lejano en ausencia de Zn medidos para los tres péptidos restantes, donde se observa que todos presentan características de péptido desordenado, con un mínimo pronunciado alrededor de 200 nm y baja señal a 220 nm, como ocurre con E6*I_{29-53} (Figura 2A).

Al igual que para E6*I_{29-53} de HPV16, el agregado de Zn produce cambios estructurales sutiles (Figura 2B, C y D), indicando que estos péptidos también unen metal. Esto es coherente con la presencia en todas las secuencias de la mitad del motivo de unión a Zn CxxC. Cabe destacar que se observó el mismo resultado en 0.6M Gdm.Cl que en ausencia del mismo (no mostrado).

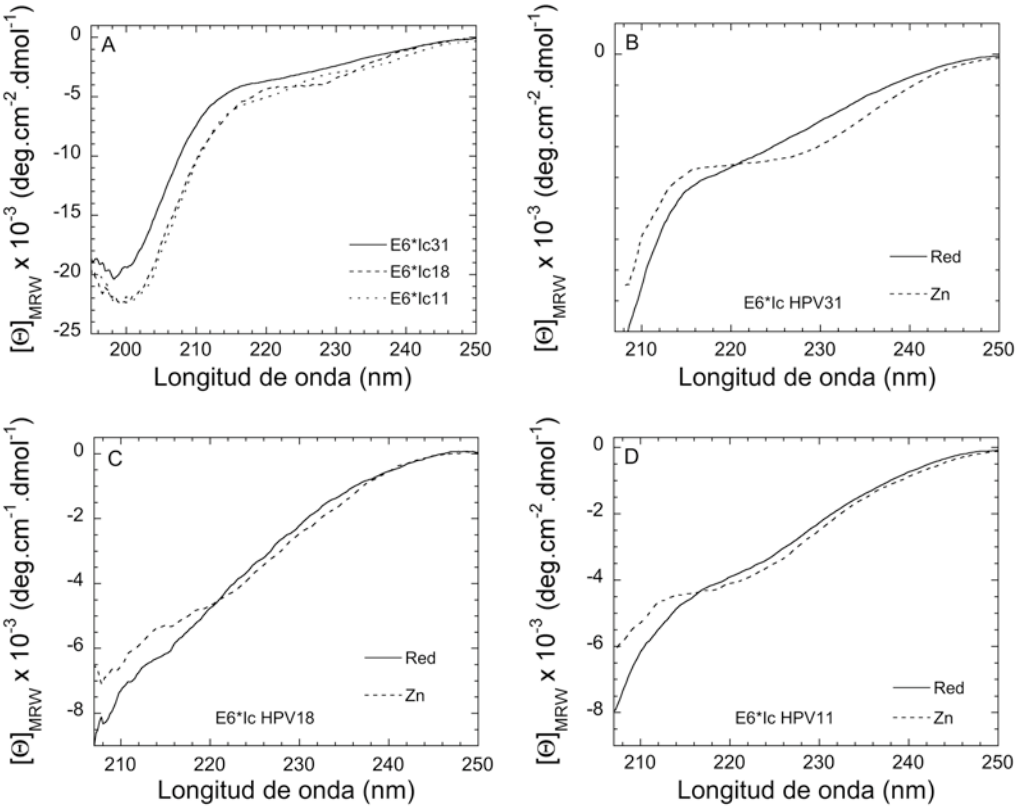


Figura 8. Estructura secundaria de los péptidos E6*Ic de los tipos virales HPV11, 31 y 18. **(A)** Espectros de DC en el UV lejano obtenidos por dilución (0.6M Gdm.Cl) en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en ausencia

de Zn de E6*Ic31 (línea entera); E6*Ic18 (línea partda) y E6*Ic11 (línea punteada). **(B), (C) y (D)** Espectros de DC en el UV lejano obtenidos por dilución (0.6M Gdm.Cl) en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en presencia (Zn-línea punteada) o ausencia de Zn (Red-línea continua) de **(B)** E6*Ic HPV31. **(C)** E6*Ic HPV18. **(D)** E6*Ic HPV11. Los espectros son medidos hasta 205 nm porque queda Gdm.Cl residual que perturba la medición. Todas las condiciones contienen TCEP como agente reductor.

*II.4.2. Efecto del TFE en E6*Ic de diferentes tipos de HPV.*

Con el fin de evaluar comparativamente las tendencias conformacionales de los diferentes péptidos seleccionados, se incubaron con concentraciones crecientes de TFE y se midió la estructura secundaria adquirida por DC en el UV lejano. Los experimentos se realizaron todos a pH 7.5, condición utilizada con E6*I_{29-53}, pudiendo modificar/afectar las tendencias a observar para los diferentes péptidos.

En los experimentos de titulación con TFE se observa que se estabilizan regiones de hélice alfa en todos los péptidos evaluados (Figura 9); a su vez, presentan diferencias en la tendencia a inducir esta estructura en ausencia o presencia de metal.

En presencia de Zn, la estabilización de estructura hélice en los péptidos E6*Ic de los tipos de alto riesgo HPV31 (Figura 9C) y HPV18 (Figura 9E) es menor que en ausencia de metal, a juzgar por la cantidad de elipticidad molar obtenida al final de la titulación. Esta diferencia también fue observada para E6*I_{29-53} de HPV16 (Figura 9A). En cambio, E6*Ic del tipo de bajo riesgo HPV11 (Figura 9F) no presenta diferencias en el número de residuos estabilizados con y sin Zn al finalizar el experimento. Otra característica que distingue este péptido de los otros tres correspondientes a tipos de alto riesgo, es que hasta 15% v/v de TFE hay agregación macroscópica de la muestra ausencia de Zn y el metal impide esta agregación

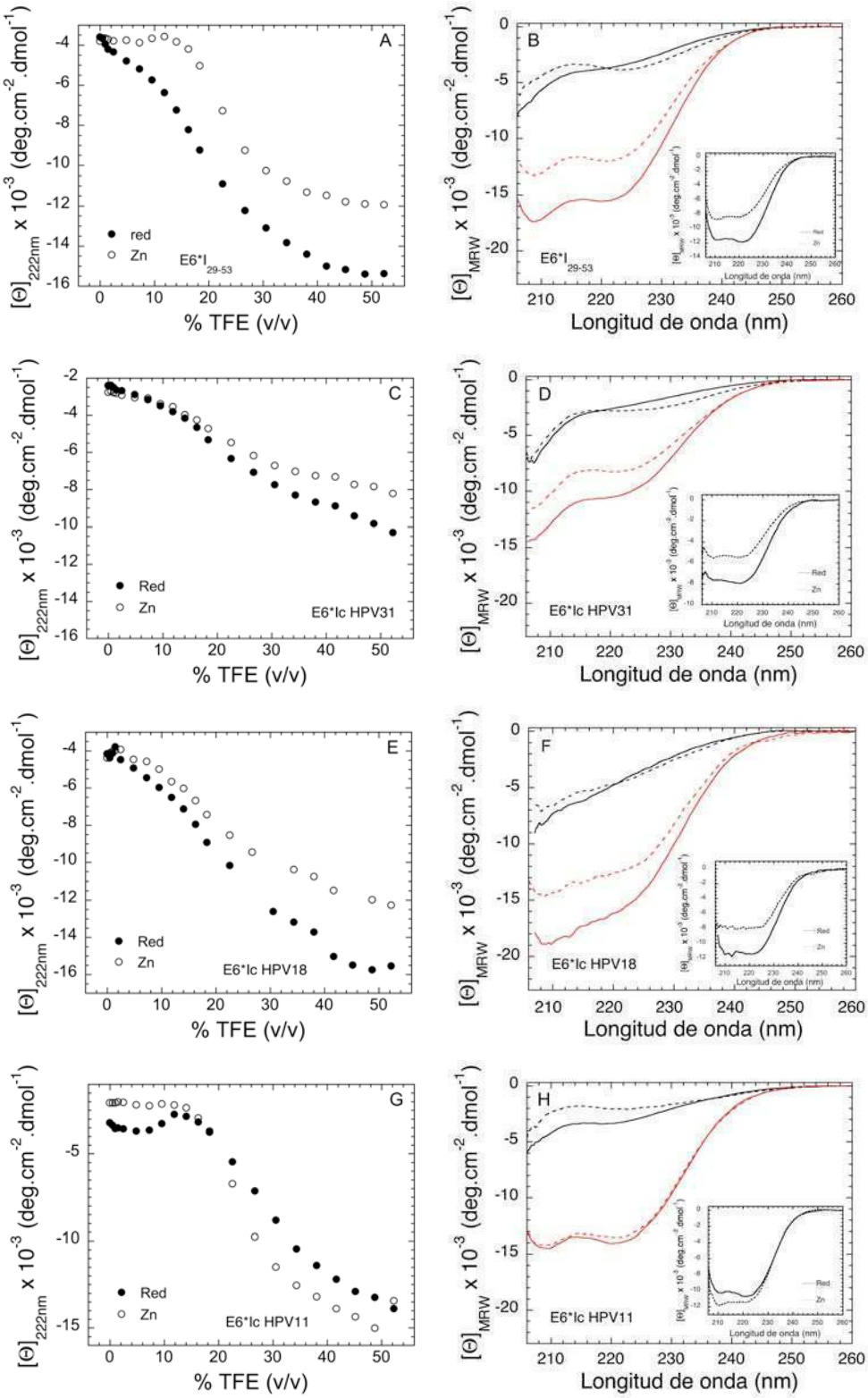


Figura 9. Efecto del TFE en la estructura secundaria de E6*Ic de HPV16, 31, 18 y 11. **(A)** Gráfico de elipticidad molar a 222 nm en función del % TFE (v/v) agregado para E6*I_{29-53}. **(B)** Espectros de DC en el UV lejano de los estados inicial (línea negra) y final (línea roja) de la titulación con TFE de E6*I_{29-53} en ausencia de Zn (Red) y con Zn (Zn). **Inserto:** espectros diferencia entre el espectro de la máxima cantidad de TFE

alcanzada y el espectro en ausencia de TFE. **(C)** Gráfico de elipticidad molar a 222 nm en función del % TFE (v/v) agregado para E6*Ic31. **(D)** Espectros de DC en el UV lejano de los estados inicial (línea negra) y final (línea roja) de la titulación con TFE de E6*Ic31 en ausencia de Zn (Red) y con Zn (Zn). **Inserto:** espectros diferencia entre el espectro de la máxima cantidad de TFE alcanzada y el espectro en ausencia de TFE. **(E)** Gráfico de elipticidad molar a 222 nm en función del % TFE (v/v) agregado para E6*Ic18. **(F)** Espectros de DC en el UV lejano de los estados inicial (línea negra) y final (línea roja) de la titulación con TFE de E6*Ic18 en ausencia de Zn (Red) y con Zn (Zn). **Inserto:** espectros diferencia entre el espectro de la máxima cantidad de TFE alcanzada y el espectro en ausencia de TFE. **(G)** Gráfico de elipticidad molar a 222 nm en función del % TFE (v/v) agregado para E6*Ic11. **(D)** Espectros de DC en el UV lejano de los estados inicial (línea negra) y final (línea roja) de la titulación con TFE de E6*Ic11 en ausencia de Zn (Red) y con Zn (Zn). **Inserto:** espectros diferencia entre el espectro de la máxima cantidad de TFE alcanzada y el espectro en ausencia de TFE. Los círculos llenos y la línea entera corresponden a la muestra en ausencia de Zn (Red) y los vacios y la línea punteada corresponden a la muestra en presencia de Zn (Zn).

Las observaciones aquí detalladas se ven reflejadas en la cantidad de residuos en hélice estabilizados al 50% v/v de TFE, indicados en la Tabla IV:

Tabla IV. Porcentaje de residuos en estructura hélice-alfa en presencia de TFE.

Péptido	% hélice en H_2O	$N_{\alpha, H2O}$	% hélice en 50% TFE	$N_{\alpha,TFE\ 50\%}$
E6*I_{29-53} Red	10.2%	2.6	43.6%	11.0
E6*I_{29-53} Zn	10.8%	2.7	33.9%	8.5
E6*Ic18 Red	11.8%	3.0	44.1%	11.0
E6*Ic18 Zn	12.4%	3.0	34.8%	8.7
E6*Ic31 Red	6.8%	1.7	29.2%	7.3
E6*Ic31 Zn	7.9%	2.0	23.3%	5.8
E6*Ic11 Red	9.2%	2.3	39.4%	9.8
E6*Ic11 Zn	5.9%	1.5	38.3%	9.6

$N\alpha$, números de residuos hélice alfa.

Valores calculados considerando la elipticidad molar a 222nm y aplicando una ecuación empírica detallada en Materiales y Métodos.

*II.4.3. Efecto del SDS en E6*Ic de diferentes tipos de HPV.*

Se analizó comparativamente el efecto del SDS sobre estos péptidos, observándose que la estabilización de estructura con este detergente presenta un comportamiento complejo (Figura 10).

En concentraciones sub-micelares de SDS (1mM) no hay estabilización de estructura en el péptido E6*Ic31 (Figura 10C). Por otro lado, en E6*Ic18 se obtiene una estabilización marginal (Figura 10E); el espectro de DC muestra un incremento en la banda negativa a 222 nm y un corrimiento del mínimo hacia longitudes de onda mayores (204 nm) indicativo de cierta inducción de estructura, mayoritariamente hélice-α. Finalmente, el péptido más susceptible a cambios conformacionales típicos generados por la presencia de concentraciones sub-micelares de SDS es E6*Ic11 (Figura 10G). El espectro obtenido corresponde a un espectro característico de estructura secundaria tipo lámina-β, con un mínimo pronunciado alrededor de 216 nm.

A concentraciones micelares de SDS (10mM) se estabiliza estructura tipo hélice-α en todos los péptidos. Las diferencias entre ellos radican en la cantidad de estructura obtenida en presencia del detergente (Tabla V).

A diferencia de lo observado en los experimentos con TFE, en presencia de SDS el efecto del Zn es marginal. Opciones plausibles de estos resultados son la pérdida del metal en presencia del detergente o la estructuración en residuos que no están involucrados en la unión del metal. También es posible que algunos péptidos pierdan el metal luego de una diálisis prolongada, probablemente debido a que poseen menor afinidad por el Zn que E6*$I_{29\text{-}53}$.

Estos resultados muestran que péptidos de una misma familia pueden tener diferencias significativas en la respuesta frente a este estabilizador. Por otro lado, el efecto del Zn en los distintos péptidos fue variable y sólo produjo cambios tan notorios como los de E6*$I_{29\text{-}53}$ en E6*Ic18. Esto es interesante considerando que la región del CxxC es la más conservada entre las 4 secuencias, y sugiere una mayor complejidad conformacional asociada a la unión a metal que una simple estructuración local.

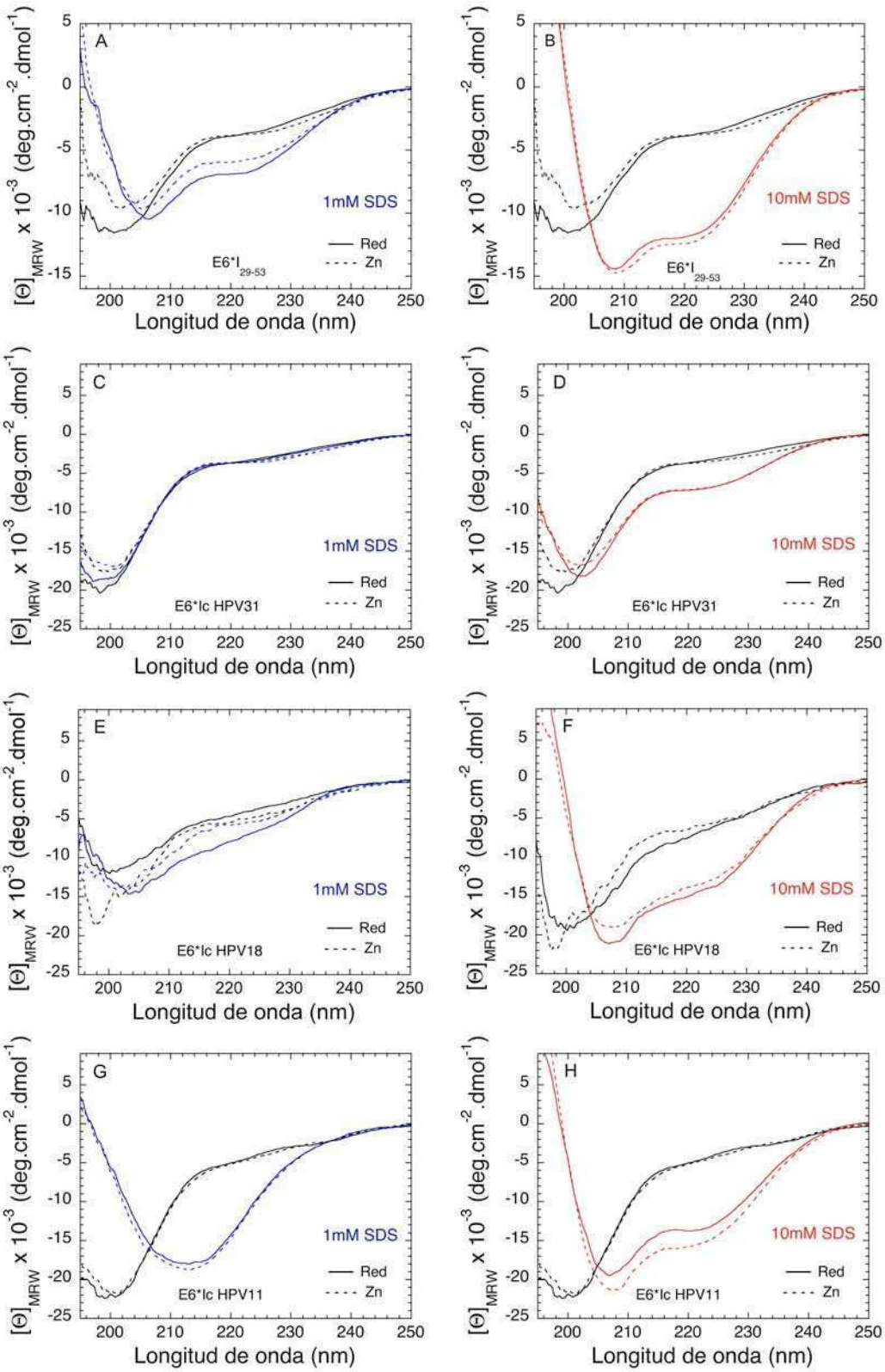


Figura 10. Efecto del SDS en la estructura secundaria de de E6*Ic de HPV16, 31, 18 y 11. Espectros de DC en el UV lejano de E6*I_{29-53} en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, TCEP **(A)** con concentración sub-micelar de SDS (1mM), **(B)** con concentración micelar de SDS (10mM). Espectros de CD en el UV lejano de E6*Ic31 en *buffer*

Tris-HCl pH 7.5, TCEP **(C)** con concentración sub-micelar de SDS (1mM), **(D)** con concentración micelar de SDS (10mM). Espectros de CD en el UV lejano de E6*Ic18 en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, TCEP **(E)** con concentración sub-micelar de SDS (1mM), **(F)** con concentración micelar de SDS (10mM). Espectros de CD en el UV lejano de E6*Ic11 en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, TCEP **(G)** con concentración sub-micelar de SDS (1mM), **(H)** con concentración micelar de SDS (10mM). La línea continua corresponde a la especie en ausencia de Zn (Red) y la punteada a la especie con Zn (Zn). Los péptdidos fueron dializados para quitar el Gdm.Cl residual que junto con el SDS dan origen a un precipitado macroscópico.

II. 5. DISCUSIÓN.

En este capítulo se analizaron las preferencias conformacionales de E6*I, focalizando en la porción C-terminal de esta molécula (E6*I_{29-53}) dado que según los resultados obtenidos con los algoritmos predictores de estructura secundaria utilizados, es la porción con mayor propensión a formar elementos de estructura secundaria canónicos y en particular hélice alfa. Esta región es la que contiene la mitad del motivo de unión a Zn CxxC de E6*I; por este motivo, y a la luz de los resultados observados en el capítulo I donde el Zn modifica sustancialmente la estructura secundaria y cuaternaria del péptido entero, las tendencias conformacionales de E6*I_{29-53} se evaluaron comparativamente en presencia y ausencia del metal.

Espectros de DC en el UV lejano muestran que E6*I_{29-53} posee características de péptido aparentemente desordenado en solución y el Zn modifica la estructura secundaria obteniendo un espectro de DC similar al de E6*I; la similitud de ambos espectros a nivel cualitativo sugiere que el efecto del Zn es local y restringido a los últimos 25 aminoácidos de E6*I. Por el contrario, E6*I_{29-53} en ausencia de Gdm.Cl no puede adquirir espontáneamente elementos de estructura secundaria canónicos en solución como lo hace E6*I entera, que forma oligómeros con alto contenido de estructura hélice-α. A partir de estos experimentos es posible afirmar que si bien el Zn afecta de igual manera a los péptidos E6*I y E6*I_{29-53}, las propiedades conformacionales de E6*I son más complejas y en parte están determinadas por los primeros 25 aminoácidos de la molécula.

Además, E6*I_{29-53} no forma estructuras de alto peso molecular como ocurre con E6*I o la proteína E6 entera; la carencia de estos primeros 25 aminoácidos también afecta las propiedades de oligomerización de la molécula E6*I entera. Este resultado permite sugerir a la porción N-terminal de E6*I como la responsable del proceso de oligomerización observado en el capítulo I para el péptido entero, y probablemente también para la proteína E6.

La diferencia observada en el espectro de DC en presencia de Zn implica que hay una región local en ambos péptidos que se modifica con la unión al metal; aunque el espectro de E6*I_{29-53} se asemeja al de un péptido desordenado, claramente esta molécula presenta algún tipo de estructuración. En este sentido, analizamos el efecto de altas concentraciones de un agente desnaturalizante como el Gdm.Cl sobre la estructura residual de E6*I_{29-53}. Los espectros en bajo y alto Gdm.Cl difieren significativamente en ambas especies; hay una pérdida importante de la señal a 220 nm indicando que E6*I_{29-53} en su estado "nativo" posee elementos de estructura dinámica, estabilizados localmente. Este experimento además sugiere que gran parte de la estructura secundaria presente en condiciones "nativas" de E6*I_{29-53} es independiente de la coordinación de metal, dado que en la especie sin metal también hay pérdida de estructura secundaria generada por el desnaturalizante. Aún en 6.0M Gdm.Cl ambas especies conservan algún tipo de estructura local; en el caso de la especie reducida se observan elementos de estructura tipo *turn*, mientras que esta estructura no se observa en la especie con Zn. La ausencia de superposición de los espectros de DC de E6*$I_{29-53,\ pH\ 7.5}$ con y sin Zn en 6.0M Gdm.Cl, nos permite inferir que el metal permanece unido en esta condición.

En general, los péptidos pequeños no exhiben mucha estructura tipo hélice-alfa en solución, ya que el costo entrópico asociado con el plegamiento de la cadena polipeptídica no es compensado por una cantidad suficiente de interacciones estabilizadoras. En ambientes más hidrofóbicos, como la membrana plasmática o en presencia de co-solventes como el TFE, los oligopéptidos fácilmente adoptan una estructura helicoidal estable. Si bien su espectro de DC en el UV lejano es similar al de un péptido desordenado, el mismo presenta elementos de estructura secundaria residual que pueden ser estabilizados por modificaciones del solvente.

Entonces, en estos casos donde los péptidos no adquieren elementos de estructura secundaria canónica en solución, un abordaje para evaluar las preferencias conformacionales y dinámicas es la utilización de estabilizadores de estructura secundaria, como los alcoholes o detergentes.

Considerando que el algoritmo AGADIR predice tendencia a formar estructura tipo hélice alfa en la región que contiene la mitad del motivo de unión a Zn, evaluamos el comportamiento de E6*I_{29-53} con y sin Zn en presencia de TFE. Los resultados confirman la tendencia de E6*I_{29-53} a formar estructura tipo hélice-α y muestran que el Zn disminuye esta tendencia, manteniendo el péptido en una conformación extendida. Los datos obtenidos en los experimentos de TFE permiten suponer que existen al menos dos

regiones de la molécula con tendencia a formar hélice alfa. Estas regiones tienen distinta propensión a adoptar este tipo de estructura; la primera solo se observa en la especie reducida, ocurre a bajas concentraciones de TFE (hasta 15%) e incluiría los residuos involucrados en la coordinación de Zn, y la segunda región, presente en las dos especies, se estructura a concentraciones mayores.

Posteriormente, se analizó la estabilización de estructura por el detergente SDS y se observó que independientemente de la concentración de SDS utilizada, E6*I_{29-53} sólo puede adoptar estructura tipo hélice. En la Tabla V se representan de manera comparativa los porcentajes de hélice obtenidos en 50% TFE y 10mM SDS:

Tabla V. Número de residuos en hélice estabilizados con TFE y SDS en los diferentes péptidos utilizados.

Péptido	N_{α}, estabilizados en TFE 50%	N_{α}, estabilizados en 10mM SDS
E6*I_{29-53} Red	11.0	8.0
E6*I_{29-53} Zn	8.5	8.6
E6*Ic18 Red	11.0	10.2
E6*Ic18 Zn	8.7	9.6
E6*Ic31 Red	7.3	5.0
E6*Ic31 Zn	5.8	5.0
E6*Ic11 Red	9.8	9.6
E6*Ic11 Zn	9.6	9.0

Nα, números de residuos hélice alfa.

Valores calculados considerando la elipticidad molar a 222nm y aplicando una ecuación empírica detallada en Materiales y Métodos.

En esta tabla se observa que el número de residuos en hélice obtenido al final de la curva de titulación con TFE para E6*I_{29-53} es mayor al observado con concentraciones micelares de SDS (11.0 y 8.0, respectivamente).

La estabilización de estas estructuras *in vivo* podría estar dada por la interacción con diferentes blancos celulares, y la consolidación de una estructura más estable favorecería dicha interacción (*143*). El SDS o el TFE le confieren condiciones ambientales que pueden simular el efecto generado por la proximidad de otras proteínas, membranas o interacciones de largo alcance con otra parte de la misma molécula.

Posteriormente evaluamos comparativamente el comportamiento conformacional de péptidos correspondientes al extremo C-terminal de E6*I de distintos tipos virales. Todos los péptidos son aparentemente desordenados en solución, es decir, carentes de estructura secundaria canónica, con espectros de DC en el UV lejano que también se modifican sutilmente por la unión del Zn a los péptidos.

Los resultados obtenidos respecto a la estabilización de estructura por parte de los aditivos TFE y SDS fueron variados para los cuatro péptidos analizados y el número de residuos en hélice obtenidos en cada condición se indican en la Tabla V. En esta tabla se observa que en los péptidos de los tipos virales HPV16 y HPV18 se obtuvo la mayor estabilización de hélice, con ~11.0 y 8.5 residuos para las especies en ausencia y presencia de Zn, respectivamente. Estos péptidos corresponden a los dos tipos virales con mayor incidencia en cáncer cervical.

El péptido E6*Ic11, perteneciente al tipo viral de bajo riesgo HPV11, es el que presenta mayores diferencias respecto de los tipos virales de alto riesgo en el comportamiento frente a ambos aditivos. A bajas concentraciones de SDS es el único péptido que adquiere estructura tipo lámina-β, y esto es coherente con la primera región de la curva de titulación con TFE (15% v/v) donde se observó una fuerte agregación de E6*Ic11 que se revierte con concentraciones mayores del solvente. Este proceso no ocurre en presencia de Zn. Además, no se observaron diferencias en el estado final en presencia y ausencia del metal, sugiriendo que esta especie podría tener menor afinidad por el Zn. Cabe destacar que en este tipo viral no existiría E6*I, dado que el ARN mensajero no posee los sitios aceptores de procesamiento alternativo (*91, 92*).

Estas diferencias en el comportamiento frente el agregado de metal son interesantes dado que pese a que la mitad del motivo de unión a Zn es la región más conservada entre estos péptidos, se observan variaciones en el comportamiento que sugieren que el efecto del Zn no es sólo local y restringido a la secuencia CxxC.

Los resultados aquí descriptos muestran una fuerte tendencia a formar hélice en la porción C-terminal de E6*I HPV16 y en particular en la región involucrada en la unión a Zn, dado que el metal disminuye la tendencia a adquirir esta estructura. Esto también fue observado con E6*I entera donde la especie sin Zn tiene un espectro claro de estructura hélice-α que se modifica drásticamente por la presencia del metal.

Por último, estos experimentos constituyen una evidencia más respecto de que espectros de DC no canónicos no implican un estado extendido desordenado; existen estructuras locales, muy dinámicas, que actúan como núcleos de plegamiento. Como se

mostró en este capítulo, elementos de estructura secundaria como PII y hélice alfa se encuentran localizados en esta región que contiene la mitad del motivo de unión a Zn y se ven modulados por la presencia del metal, aunque los primeros 25 residuos de E6*I entera aportan una mayor complejidad conformacional a la molécula.

CAPÍTULO III:

Rol de las cisteínas en el comportamiento de E6*I en solución

En el logo de secuencias presentado en el capítulo I se evidencia una alta conservación de los residuos cisteínas presentes en las proteínas E6 de HPV. En este capítulo nos centraremos en la evaluación del rol que cumplen las cisteínas en el contexto de E6*I.

E6*I HPV16 contiene tres cisteínas, donde las cisteínas 37 y 40 están estrictamente conservadas a lo largo de todas las secuencias de E6*I mientras que la cisteína 23 está altamente conservada y sustituida en sólo 6 tipos de papilomavirus de alto riesgo por un residuo serina (Figura 1). Estudios realizados analizando la degradación de p53 como parámetro funcional, indican que la mutación de la cisteína 23 en el contexto de la proteína entera no altera la función de la misma (*80*); las cisteínas 37 y 40 estrictamente conservadas son estructurales, formando parte de un motivo de unión a Zn ($CxxCx_{29}CxxC$) presente en el domino N-terminal de la proteína E6 entera.

Figura 1. **Alineamiento de secuencias de E6*I de tipos de alto riesgo.** Logo bar donde se observa el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas E6*I (fragmento del dominio N-terminal de las proteínas E6 de tipos de alto riesgo).

Este arreglo se encuentra conservado en la gran mayoría de los papilomavirus y no corresponde a un dominio *Zn finger* clásico dado que la distancia que separa los dos motivos de cisteínas (29 aminoácidos) es mayor que la observada comúnmente en los dominios *Zn finger* (*58*). Este dominio sólo guarda homología de secuencia con el dominio C-terminal de E6 y con la oncoproteína E7 de HPV (Figura 2).

```
E7Ct      41 ---------------PAG----QAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLED 82
E6Nt       1 MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL-LRREVYDFAFRDLCI 59
E6Ct      81 ------SEYRHYCYSVYGT-TLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFH 133
                                          : : .  :::  *  *.. *    :  ..  :
E7Ct      83 LLM-GTLGIVCPICSQKP-------- 98
E6Nt      60 VYRDGNPYAVCDKCLKFYSKI----- 80
E6Ct     134 NIR-GRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL 158
                 *     *  * :
```

Figura 2. **Alineamiento según el Clustal W de los dominios que unen Zn presentes en HPV16 E6 y E7.** La división de dominios se realiza de acuerdo a los dominios estructurales resueltos de E6 C-terminal (*80*) y

E7 C-terminal. En rojo se muestran los residuos no polares, en verde los polares, en azul los ácidos y en rosa los básicos. Se subrayaron en cada dominio los CxxC involucrados en la coordinación de Zn.

La homología existente apoya la hipótesis de la ocurrencia de un evento temprano de duplicación génica, a partir del cual se originaron ambas oncoproteínas del virus (*58*). Fue propuesto que el ancestro común de los PVs actuales tenía un genoma que codificaba sólo para las proteínas de expresión temprana E1 y E2 involucradas en la replicación y las proteínas estructurales de expresión tardía L1 y L2 (*144*). La incorporación de un gen temprano al genoma de PV fue un acontecimiento crucial. Al no ser una parte esencial de la maquinaria de replicación del virus, el nuevo gen fue capaz de desarrollar nuevas funciones de forma rápida jugando un rol adaptativo en la infección de nuevos huéspedes y tejidos (*144*). Esto llevó a cambios drásticos en la secuencia y la estructura durante la evolución de los PV. Antes de la diversificación de estos virus, el gen se duplicaó, dando lugar a los ORF E6 y E7 existentes en la actualidad (*58, 145*). El origen común de E6 y E7 se refleja tanto en las similitudes de secuencia como en las de estructura (*58, 145*); su antepasado fue probablemente un dominio con dos sitios de unión a Zn, cada uno compuesto por dos motivos CxxC. Al principio, la proteína E6 perdió uno de los sitios de unión de Zn (*145*), y luego de la divergencia entre los PVs de aves/reptiles y mamíferos, el gen de E6 sufrió un evento de duplicación interna y alcanzó su forma actual (*107*).

Dentro de los 20 aminoácidos presentes en las proteínas, la cisteína es uno muy particular presentando varias características únicas; aunque es uno de los menos abundantes, a menudo se lo observa en sitios funcionalmente importantes de las proteínas. El porcentaje de ocurrencia del aminoácido cisteína en proteínas es de 1.7%, siendo el menos abundante después del triptófano cuya frecuencia es de 1.3%.

El residuo cisteína es reactivo, polarizable, modificable por reacciones de oxido-reducción, tiene alta afinidad por metales y es particularmente sensible al entorno local. El grupo tiol de su cadena lateral posee carácter nucleofílico, es fácilmente oxidable y la oxidación o reducción de este aminoácido ocurre en un rango de potenciales de oxido-reducción compatibles con aquellos que pueden encontrarse en una célula (*146, 147*), lo que lo diferencia de otros aminoácidos oxidables como el triptófano, la tirosina o la histidina. La metionina es otro residuo con un átomo de azufre que también puede oxidarse a sulfóxido y sulfona, aunque su rol regulatorio no es claro y es considerado como un evento de envejecimiento proteico. Debido a su alta reactividad, el grupo tiol de la cisteína tiene numerosas funciones biológicas sufriendo modificaciones post-

traduccionales que regulan la función de la proteína portadora de estos residuos. La modificación más estudiada es su oxidación a cistina con la consecuente formación de un puente disulfuro. Sin embargo, la cisteína puede existir en otros estados de oxidación, como es en la forma de ácido sulfénico, ácido sulfónico o formando un radical libre cisteinil (*147, 148*). Todas estas especies se han encontrado en proteínas y se demostró la importancia para la regulación de sus funciones y de los procesos celulares involucrados (*148, 149*).

Las cisteínas tienen una amplia diversidad funcional en proteínas, que abarcan desde la estabilización estructural hasta la actividad catalítica, incluyendo una variedad de modificaciones post-traduccionales y sus roles regulatorios asociados. Por lo tanto, es útil clasificar a estos residuos en base a su función, aunque es importante destacar que no todas las cisteínas pueden ser clasificadas sin ambigüedades (*150*). Las diferentes categorías funcionales de las cisteínas incluyen:

(i) *cisteínas estructurales*, donde la formación de puentes disulfuro es el mecanismo más utilizado por las proteínas en la estabilización entrópica de sus estructuras. Estos son frecuentes en proteínas localizadas en ambientes celulares oxidantes, como el periplasma bacteriano, el retículo endoplasmático y el espacio intermembrana mitocondrial de eucariotas, así como también en proteínas secretadas.

(ii) *cisteínas involucradas en la unión a metal*. Junto con la histidina, la cisteína es el aminoácido utilizado con mayor frecuencia en la coordinación de metales (*151*). En proteínas, los metales poseen numerosas funciones, estabilizando elementos estructurales o estando directamente involucrados en catálisis o regulación, como cofactores. Muchas cisteínas que unen metal son reguladas por reacciones de oxido-reducción, como por ejemplo ocurre con la chaperona bacteriana Hsp33 que dependiendo de las condiciones del entorno se oxida y libera el Zn fuertemente unido a la proteína; las cisteínas involucradas en la coordinación forman un puente disulfuro intramolecular cuyo cambio conformacional induce la activación de la proteína (*152*).

(iii) *cisteínas catalíticas*, subdividiendo esta categoría en cisteínas catalíticas redox o no-redox. Esta división se basa en evaluar si ocurre una modificación reversible en el estado de oxidación de la cisteína durante la catálisis. Ejemplos de cisteínas redox son las presentes en enzimas conocidas como oxidoreductasas, mientras que ejemplos de cisteínas no redox son las que se encuentran en el sitio activo de ciertas fosfatasas o proteasas.

(iv) *cisteínas regulatorias*, que sirven como sitios de modificaciones post-traduccionales. Las modificaciones post-traducciones (MPT) reversibles más comunes de las cisteínas incluyen la formación de puentes disulfuro, ácido sulfénico, S-nitrosilación y glutationilación. Todas estas modificaciones mencionadas están basadas en cambios en el estado redox del residuo y son reversibles, formando parte muchas veces de la respuesta regulatoria a cambios en el ambiente; sin embargo, otras modificaciones importantes de cisteínas, las cuales son estables y no involucran cambios en el estado redox, también ocurren dentro de la célula: ejemplos son modificaciones que dan origen a la unión covalente lípido-proteína y su anclaje en membrana, o la unión covalente de cofactores como el grupo hemo.

(v) *"cisteínas huérfanas",* denominadas así a aquellas cisteínas que no se les conoce una función específica, están poco conservadas y tienden a ser reemplazadas a lo largo de la evolución por otros residuos.

E6*I HPV16 tiene 3 cisteínas altamente conservadas que constituyen el 6% de su secuencias primaria, superando ampliamente el porcentaje de ocurrencia promedio de este residuo en proteínas. Por consiguiente, su alta frecuencia y grado de conservación sugieren un rol funcional de las cisteínas en el polipéptido; en el contexto de E6*I, estos residuos podrían cumplir un rol estructural, estabilizando la estructura adquirida a través de puentes disulfuro como ocurre con muchos péptidos pequeños, por ejemplo péptidos antimicrobianos (*153*). Además, podrían ser relevantes estructuralmente a través de la coordinación de Zn, como ocurre en la proteína E6 entera. Finalmente, ambos procesos podrían modular el efecto biológico de E6*I.

En los capítulos I y II se observaron indicios de modificaciones post-traduccionales de las cisteínas presentes en E6*I y de modificaciones conformacionales asociadas a la presencia de Zn, por lo que en este capítulo se analizarán las propiedades de oxido-reducción y de unión a metal de este péptido.

III.1. ANÁLISIS DEL ESTADO REDOX DE E6*I.

Dado el alto contenido de cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de E6*I y la tendencia a la precipitación observada en ausencia de reductores en la solución de trabajo, fue de interés caracterizar el comportamiento redox de este polipéptido.

Para evaluar la tendencia de E6*I a la oxidación se utilizó la técnica de HPLC en fase reversa (RP-HPLC), técnica analítica que permite diferenciar entre especies con

diferentes estados de oxidación basándose en la exposición diferencial de aminoácidos que poseen las especies reducidas y oxidadas. El acoplamiento de este procedimiento a la espectrometría de masas MALDI-TOF la convierte en una técnica muy poderosa para identificar modificaciones post-traduccionales en péptidos y proteínas.

En la Figura 3 se muestran los perfiles de elución obtenidos para E6*I antes y después de incubarlo en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 durante 24 horas a temperatura ambiente, donde se observan dos especies únicas con una diferencia de tiempos de retención de aproximadamente 4 minutos. El agregado de exceso de DTT a la especie obtenida luego de 24 horas de incubación en ausencia de reductor genera la reversión del perfil de elución, obteniendo ahora un único pico de tiempo de retención mayor (no mostrado). Estos resultados indican que los dos picos observados corresponden a E6*I completamente oxidada y completamente reducida, siendo esta última la especie que posee mayor tiempo de retención. Por otro lado, la reversibilidad observada en la reacción de oxidación sugiere que el residuo que se está oxidando es la cisteína, dado que la oxidación de metioninas no se modifica con agentes reductores como el DTT. Finalmente, este experimento demuestra que la técnica de RP-HPLC es válida para evaluar las cinéticas de oxidación espontánea de E6*I.

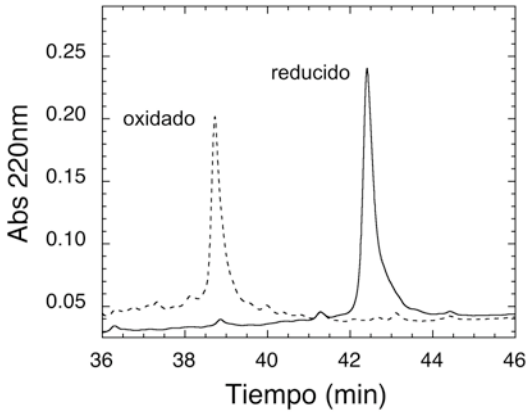


Figura 3. RP-HPLC de E6*I. Perfil de elución de E6*I completamente reducida (línea continua) y completamente oxidada (línea punteada) en columna C18.

Con el objetivo de evaluar la cinética de oxidación espontánea de E6*I se diseñó el siguiente experimento: una muestra concentrada de péptido desnaturalizado y reducido en 6.0M Gdm.Cl se diluye en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en presencia o ausencia de un reductor fuerte como el TCEP y en presencia o ausencia de Zn. Estas condiciones se analizaron en soluciones con Gdm.Cl residual (0.6M Gdm.Cl) y en 6.0M Gdm.Cl, para

evaluar posibles contribuciones conformacionales en las cinéticas observadas. A distintos tiempos se tomaron alícuotas y se agregó ácido trifluoroacético (TFA) para detener la reacción de oxidación, se inyectaron en una columna de fase reversa y las especies presentes se cuantificaron mediante la integración de las áreas utilizando el programa del equipo de HPLC.

En la Figura 4 se representan los distintos perfiles de HPLC obtenidos en los experimentos realizados (Figura 4A, B); a partir de estos cromatogramas se calculó el área bajo la curva de la especie reducida y se graficó en función del tiempo para analizar las cinéticas de oxidación espontánea de E6*I (Figura 4C, D).

Se observó que en Gdm.Cl residual en ausencia de reductor, la tendencia de E6*I a oxidar es alta con un t ½ de 0.3 horas (18 minutos). Los cromatogramas de E6*I oxidada en esta condición presentan varios picos además de las especies completamente oxidada o reducida, reforzando lo observado en el capítulo I, donde la especie sin reductor y sin metal en ausencia de desnaturalizante tiene mucha tendencia a la precipitación, probablemente por oxidaciones intermoleculares. Esto dificulta definir las áreas a integrar por lo que el t ½ es estimativo.

En condiciones desnaturalizantes (6.0M Gdm.Cl) el t ½ es de 1.1 horas (aproximadamente 66 minutos), en el orden del t ½ observado en bajo Gdm.Cl; esto sugiere la ausencia de un componente conformacional en la reacción de oxidación observada por HPLC o que la reacción de oxidación observada es local. La presencia de TCEP evita esta oxidación, en concordancia con lo esperado si los responsables de la reacción son los residuos cisteínas. Interesantemente, el metal Zn también previene la oxidación, indicando fuertemente la participación de las cisteínas correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn en este proceso. Cuando el experimento se realizó en 6.0M Gdm.Cl en presencia de Zn se observa a las 24 horas una oxidación parcial de E6*I (38.0% de péptido oxidado, ver Tabla I) con un t ½ de 36.7 horas, sugiriendo en este caso un requerimiento conformacional en la unión a Zn para proteger completamente al péptido de la reacción de oxidación.

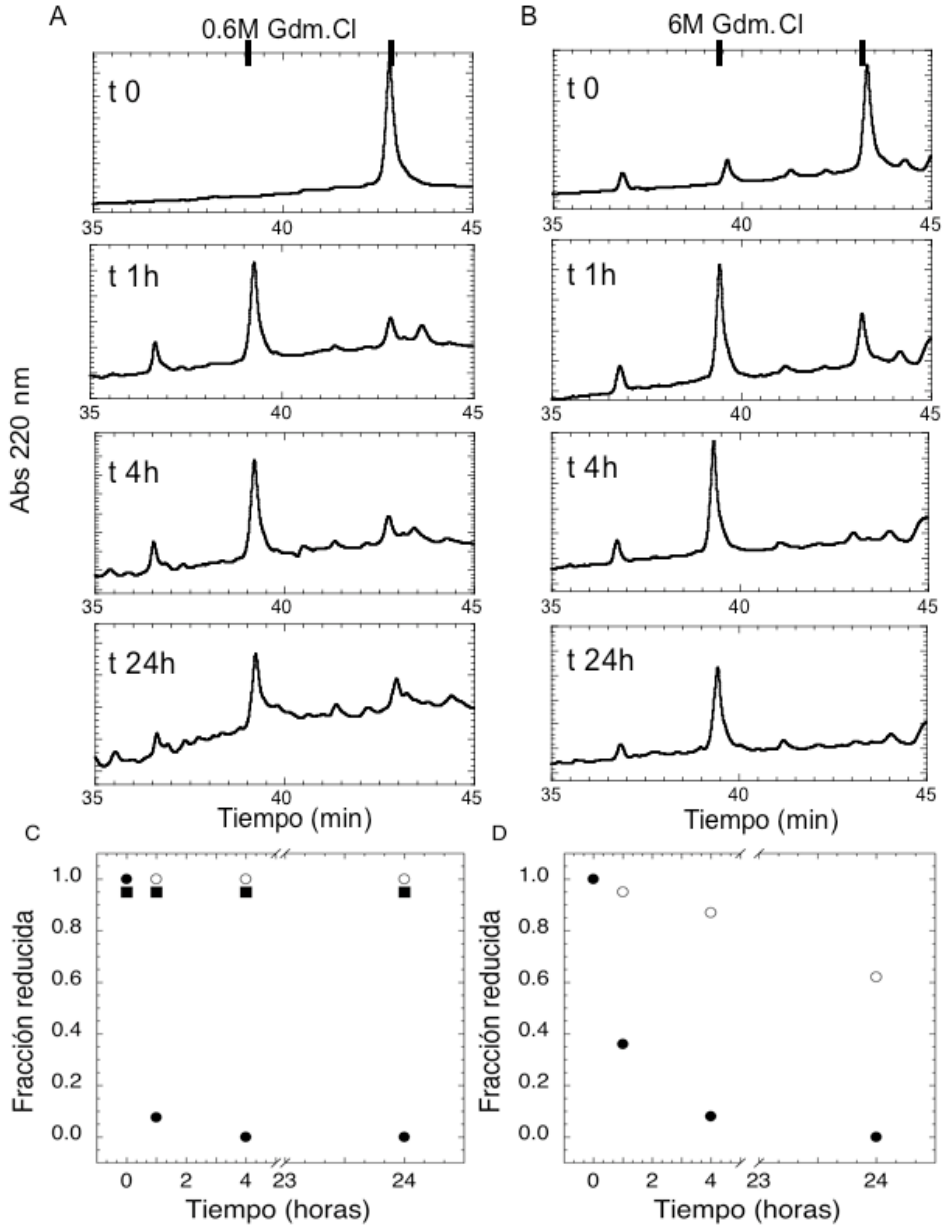


Figura 4. Cinética de oxidación espontánea de E6*I monitoreada por RP-HPLC. **(A) y (B)** Cromatogramas de las muestras analizadas a distintos tiempos de incubación para **(A)** E6*I en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 0.6M Gdm.Cl; **(B)** E6*I en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 6.0M Gdm.Cl. **(C) y (D)** Gráficos de Fracción reducida, obtenida como el área bajo la curva del pico de HPLC, en función del tiempo de **(C)** E6*I en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 0.6M Gdm.Cl (circulo negro), en presencia de 5.0mM TCEP (cuadrado negro) y en presencia de 50.0μM Zn (círculo vacío); **(D)** E6*I en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 6.0M Gdm.Cl (círculo negro) y en presencia de 50.0μM Zn (círculo vacío).

Tabla I. Oxidación de E6*I en 24 horas. Tabla donde se representa el % de la especie de E6*I oxidada presente en la solución luego de incubar el péptido 24 horas en cada condición.

Condición	Gdm.Cl (M)	% pico oxidado $_{t\ 24hs}$	$t_{1/2}$ (horas)
E6*I	0.6	100%	0.3
E6*I	6.0	100%	1.1
E6*I-Zn	0.6	0%	Nd[a]
E6*I-Zn	6.0	38%	36.7

[a] No se observó oxidación en el tiempo de incubación del experimento.

Estos experimentos demuestran la existencia de una reacción de oxidación reversible de algún residuo cisteína presente en E6*I, siendo la formación de sulfénico o de un puente disulfuro las opciones más probables. Finalmente, el efecto observado en presencia de Zn sugiere que al menos las cisteínas de la mitad del motivo de unión a Zn están involucradas en la reacción de oxidación.

III.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES OXIDADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS MALDI-TOF.

Para identificar la modificación post-traduccional observada y los aminoácidos involucrados en esta reacción de oxidación, se utilizó la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF.

La espectrometría de masas es una técnica de análisis basada en la separación de acuerdo a las relaciones masa/carga (m/z) de las especies cargadas formadas a partir de la ionización de una muestra. Se trata de una técnica extremadamente sensible, precisa y de gran versatilidad que suministra información muy valiosa sobre las moléculas evaluadas: la masa molecular, la fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular así como la composición isotópica en sustancias naturales o marcadas. El MALDI-TOF (del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) es un método de ionización suave utilizado en espectrometría de masas para analizar biomoléculas.

De este modo, con un espectrómetro MALDI-TOF, la macromolécula se cristaliza junto a una matriz y se irradian con un láser pulsado en alto vacío que permite la

vaporización e ionización de la muestra. Una vez vaporizada, el haz de iones pasa al analizador que en este caso acelera los iones a la misma energía cinética por el paso a través de un campo eléctrico y mide los tiempos que toman los diferentes iones para alcanzar el detector. Aunque la energía cinética es igual, la velocidad es diferente, permitiendo diferenciar moléculas con diferente relación m/z. En general, en MALDI-TOF las moléculas son monocargadas (H^+) por lo que su m/z se corresponde con el peso del ion molecular. Esta técnica tiene una gran precisión y resolución permitiendo, como se mencionó anteriormente, la detección de modificaciones post-traduccionales en péptidos y proteínas.

El péptido E6*I reducido posee un peso molecular de 6130.11 Da de acuerdo a su secuencia primaria. Cuando se analizan por MALDI-TOF las muestras correspondientes a E6*I totalmente reducida y totalmente oxidada se obtienen valores de m/z de 6128.79 y 6128.78 Da, respectivamente, no pudiendo detectarse una diferencia de peso entre las dos especies (Figura 5) dentro del error experimental (0.1% o 6.0Da). De acuerdo a la resolución que posee el equipo, una diferencia de peso de al menos +16.0 asociada a la formación de un grupo sulfénico se debería poder detectar. Dado que la oxidación estudiada se revierte con DTT y no se observan diferencias de masa asociadas a la incorporación de moléculas de oxígeno a las cisteínas, la modificación más probable es la formación de un puente disulfuro. El puente disulfuro ocurre con un cambio de masa de -2.0, correspondiente a la pérdida de dos protones, que no puede ser resuelto con este tipo de experimento. Por otra parte, en los espectros sólo se observa la especie monómerica sugiriendo que el puente sería intramolecular.

Con el fin de confirmar esta hipótesis se utilizó iodoacetamida, reactivo que se une covalentemente a los residuos cisteína que se encuentran accesibles y reducidos; de esta manera se incorporan 57.0Da por cisteína a la que se une, siendo posible identificar la diferencia en el peso molecular al analizar los valores de m/z en el MALDI-TOF. Aquellas cisteínas que estén oxidadas no modificarán su valor m/z dado que no reaccionarán con la iodoacetamida.

Cuando se analizaron los espectros de MALDI-TOF de las especies de E6*I, se obtuvo una señal de m/z de 6182.9 para la especie oxidada y una de 6302.3 para la reducida, correspondiendo a la incorporación de 1 y 3 moléculas de iodoacetamida, respectivamente (Figura 5).

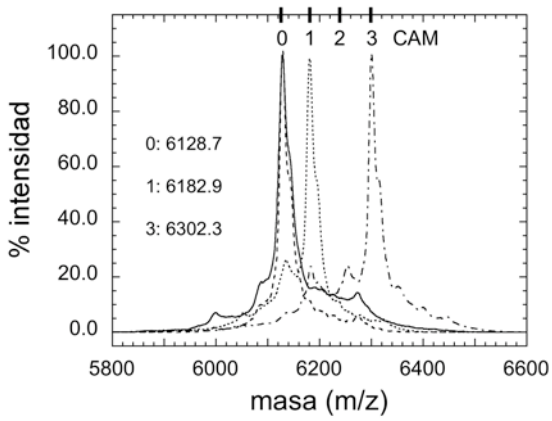


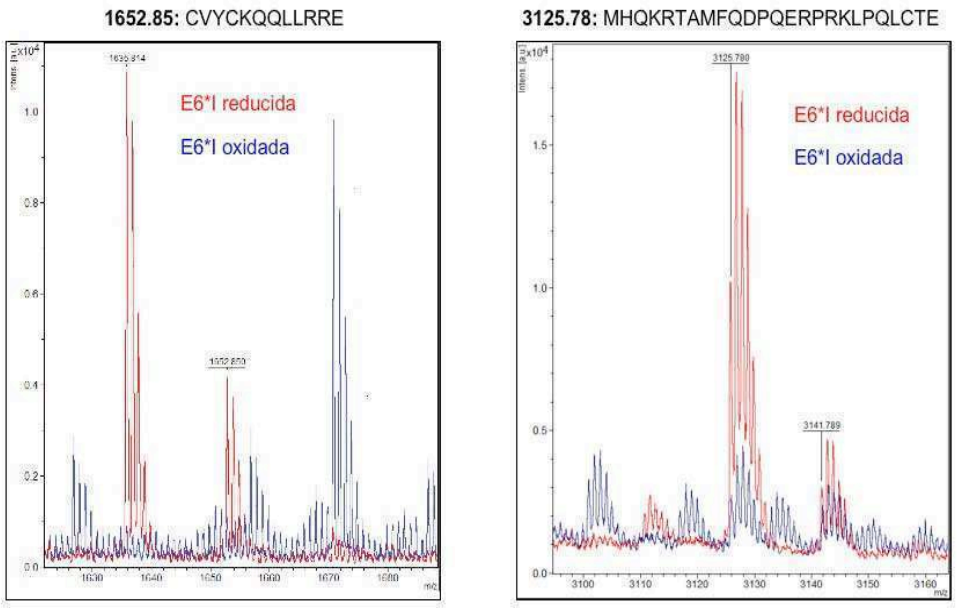
Figura 5. Análisis de la conectividad de E6*I por espectrometría de masas MALDI-TOF. Espectros de MALDI-TOF adquiridos en modo lineal positivo de las especies de E6*I reducida y oxidada en presencia y ausencia de iodoacetamida. Las señales a m/z 6128.78 y 6128.79 corresponden a E6*I completamente oxidada y reducida, respectivamente; la señal a m/z 6302.31 corresponde a E6*I después de reducir y carboximetilar (CAM) y la señal a m/z 6182.94 corresponde a la forma de E6*I oxidada y alquilada, donde se incorporó sólo una molécula de IAA.

Dado que los pesos moleculares de las especies observadas en los espectros corresponden al monómero de E6*I y que la especie oxidada tiene una única cisteína reactiva, este experimento indica que la reacción de oxidación observada es la formación de un puente disulfuro intramolecular.

Posteriormente, se prosiguió a identificar la conectividad de las cisteínas que forman este puente disulfuro. Se digirieron ambas especies de E6*I tratadas con iodoacetamida con la enzima Endo-Glu; esta enzima es una proteasa que digiere en aquellas posiciones de las secuencias proteicas ocupadas por ácidos glutámicos y aspárticos, generando en el caso de E6*I dos fragmentos de interés, uno que contiene la cisteína 23 y el otro con las cisteínas 37 y 40, que constituyen la mitad del motivo de unión a Zn (Figura 6).

La Figura 6A muestra dos regiones del espectro correspondientes a la digestión de las especies de E6*I en sus estados completamente reducido y completamente oxidado, donde se observa que el péptido con la cisteína 23 unida a una molécula de IAA se encuentra presente en ambas especies (Figura 6A, Derecha) mientras que el fragmento con las cisteínas 37 y 40 iodoacetamidadas aparece únicamente en la especie reducida (Figura 6A, Izquierda).

A



Muestra	Fragmento (Cys)	Inicio	Fin	Teórico	Observado
E6*I Oxidada	**C**VY**C**KQQLLRRE	37	48	1536.73	1536.79
	MHQKRTAMFQDPQERPRK LPQLC(**CAM**)TE	1	25	3125.67	3125.55
E6*I Reducida	C(**CAM**)VYC(**CAM**)KQQLLR RE	37	48	1652.69	1652.83
	MHQKRTAMFQDPQERPRK LPQLC(**CAM**)TE	1	25	3125.35	3125.55

B

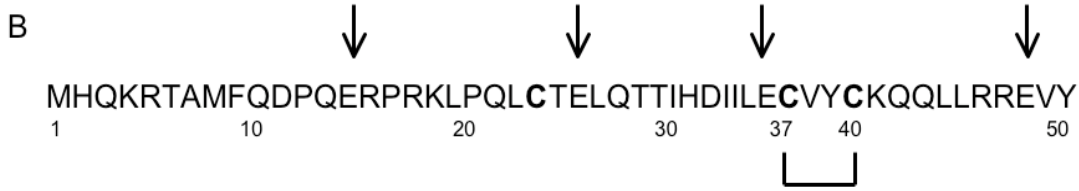


Figura 6. Conectividad del puente disulfuro de E6*I. (A) Digestión con Endo-GluC y posterior análisis por MALDI-TOF. Se observan dos regiones significativas del espectro de MALDI. **Izquierda**: péptido 1652.8 que contiene las CxxC alquiladas. **Derecha:** péptido 3125.8 que contiene la C23 alquilada. En rojo se indica la especie reducida y en azul la oxidada. En la **Tabla II** se observan los fragmentos relevantes que permitieron determinar la conectividad de la oxidación. **(B)** Esquema de la conectividad del puente disulfuro de E6*I deducido a partir de los experimentos de MALDI-TOF. En línea negra se muestra el puente disulfuro y las flechas indican los sitios de corte para la proteasa Endo-gluC.

Los datos obtenidos en el experimento están representados en la Tabla II, donde se muestra que en el péptido oxidado la única cisteína reactiva capaz de alquilarse es la

número 23, mientras que en la especie reducida los dos fragmentos (que abarcan las tres cisteínas) poseen las cisteínas iodoacetamidadas.

De estos experimentos se puede concluir que la reacción de oxidación espontánea observada con E6*I, corresponde a la formación de un puente disulfuro intramolecular entre las cisteínas vecinas 37 y 40 que constituyen la mitad del motivo de unión a Zn. La presencia de este metal inhibe la oxidación indicando que, al igual que la proteína E6 entera, E6*I también tiene la capacidad de unir Zn.

III.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL REDOX DEL PUENTE DISULFURO DE E6*I.

Como se mencionó anteriormente, la modificación post-traduccional de la cisteína más estudiada es su oxidación a cistina con la consecuente formación de un puente disulfuro; esta reacción se encuentra involucrada en un gran número de procesos biológicos que van desde el plegamiento y estabilidad proteica hasta la regulación de la expresión génica y actividad catalítica. Debido a que es un proceso reversible, la estabilidad del puente disulfuro a menudo juega un rol importante en su utilidad biológica. A su vez, la habilidad de formar y romper un puente disulfuro específico bajo condiciones biológicas apropiadas depende de la naturaleza del oxidante o reductor, la estabilidad del disulfuro, la cinética de ambas reacciones, y la naturaleza y estado redox del entorno donde ocurre la reacción.

Dada la reacción de oxidación caracterizada previamente surge el interrogante respecto de la estabilidad que tiene el puente disulfuro en E6*I; por este motivo, se midió la fuerza de esta reacción a través de la medición de su potencial de oxido-reducción. Para la medición del potencial redox, se analizó el intercambio del puente disulfuro de E6*I con el de un par redox cuyo potencial es conocido; en este caso se utilizó la cupla DTT_{red}/DTT_{ox}. Como la especie de E6*I oxidada tiene mayor tendencia a agregar que la especie reducida, las mediciones se realizaron en presencia de 6.0M Gdm.Cl. En general, en polipéptidos pequeños el potencial está determinado por la distancia entre los aminoácidos y la secuencia específica alrededor de los residuos que se oxidan, por lo que determinarlo en condiciones desnaturalizantes no afectaría el resultado (*154*).

Se incubó E6*I totalmente reducida con diferentes relaciones de DTT_{red}/DTT_{ox} (R) durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir alcanzar el equilibrio, y luego de detener la reacción con TFA se inyectó en una columna de fase reversa (C18). A partir de

las fracciones de péptido reducido obtenidas en las distintas condiciones medidas, se determinó la constante de equilibrio mediante la ecuación:

$R = ([DTT_{red}] / [DTT_{Ox}]) / (K_{eq} + [DTT_{red}] / [DTT_{Ox}]$

donde R es la fracción de péptido reducido en el equilibrio, y K_{eq} es la constante de equilibrio con la que, a través de la Ecuación de Nerst (ver Materiales y Métodos), se obtuvo el potencial de la reacción de oxidación de las cisteínas 37 y 40 de E6*I (Figura 7).

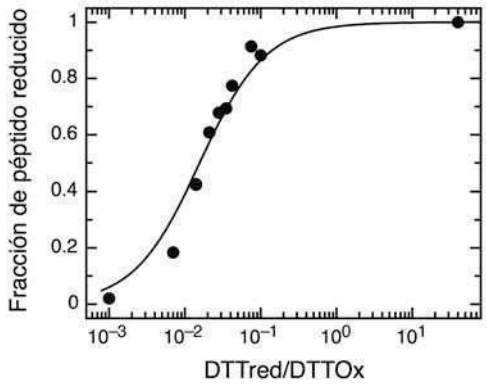


Figura 7. Determinación del potencial redox del puente disulfuro de E6*I. Se graficaron las fracciones reducidas de E6*I obtenidas luego de incubar con diferentes relaciones del par redox DTT_{red}/DTT_{ox} en función de la relación DTT_{red}/DTT_{ox} (R). Los datos se analizaron como se indica en Materiales y Métodos. La constante de equilibrio (K_{ox}) y el potencial redox estándar determinado para E6*I a 25℃, pH 7.5 y en 6.0M Gdm.Cl fue de 0.016 y –254mV, respectivamente.

La K_{ox} obtenida para la oxidación de las cisteínas vecinas C37 y C40 fue de 0.016 correspondiendo a un potencial redox de -254mV. Este valor esta dentro de los valores medidos para proteínas oxidoreductasas con mucha tendencia a oxidarse como las tioredoxinas (*154*).

III.4. PROPIEDADES DE UNIÓN A ZN.

En los experimentos de oxidación analizados por HPLC se observó que el Zn evitaba la formación del puente disulfuro constituido por las cisteínas 37 y 40, correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn de la proteína E6 entera. Además, en el capítulo I se demostró que el metal modifica la estructura secundaria y las propiedades conformacionales de E6*I. Todas estas evidencias respecto a la unión del péptido al Zn y la relevancia del metal en el contexto de la proteína E6 entera, llevaron a caracterizar las propiedades de unión a Zn de E6*I.

Inicialmente se realizó una cuantificación colorimétrica utilizando el ensayo de PAR-PMPS (*155*) para estimar la estequiometria del Zn unido a E6*I. El 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) es un colorante que une Zn, formando un complejo Zn $(PAR)_2$ coloreado; este complejo absorbe fuertemente a 500 nm. Sin embargo, la afinidad del PAR por el Zn es más baja que la de muchos centros de coordinación constituidos por cisteínas (K_a= 2.5 x 10^{12} M^{-1}, a pH 7.0) por lo que el Zn unido fuertemente no puede ser extraído por este compuesto. Para detectar este Zn, se utilizan reactivos modificantes de tioles, como el p-(hydroxymercuri)benzenosulfonato (PMPS). El PMPS reacciona estequiométricamente con las cisteínas reducidas para formar un enlace mercaptido-tiol utilizando el siguiente mecanismo de reacción:

R-HgOH + P-SH → R-Hg-S-P + H2O

donde R representa el grupo fenil-ácido sulfénico del PMPS y P la proteína. Si los tioles de la proteína están involucrados en la coordinación de metal, ésta modificación covalente genera la liberación del mismo que es inmediatamente captado por el reactivo PAR, formando el complejo colorimétrico.

El metal unido a E6*I se cuantificó comparando los valores de absorbancia a 500 nm con curvas patrón de Zn en ausencia y presencia de PMPS. Las muestras analizadas se obtuvieron replegando por dilución una solución madre de E6*I concentrada y desnaturalizada en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 y 1.5 equivalentes de Zn; se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se purificó utilizando una columna de desalado PD-10. En las diferentes mediciones realizadas, se observó que sólo el agregado de PMPS puede generar la liberación del metal unido a E6*I, obteniendo 0.5 moles de Zn por mol de péptido. Esto sugiere la formación de un dímero unido por una molécula de metal que se encontraría formando un centro de coordinación de alta afinidad, donde los potenciales ligandos de esta unión son las cisteínas 37 y 40, correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn.

Posteriormente se analizó la afinidad aparente del complejo E6*I-Zn a través de ensayos de competencia con el PAR. Cuando se agrega una cantidad estequiométrica de E6*I reducido y desplegado a una solución con el complejo Zn $(PAR)_2$, se observa un descenso instantáneo en la absorbancia a 500 nm correspondiente al desplazamiento del metal unido al PAR (Figura 8). Considerando la constante previamente reportada para el complejo Zn $(PAR)_2$ (K_D de 10^{-12} M) (*155*), nuestro resultado indica que la afinidad de la interacción E6*I-Zn es mucho mayor que la del complejo Zn $(PAR)_2$ (K_D << 10^{-12} M),

especialmente si se considera la cinética rápida de extracción del metal observada. La adición del reactivo PMPS disoció completamente el complejo E6*I-Zn confirmando nuevamente la relevancia de las cisteínas en la unión al metal. Finalmente, en presencia de exceso de DTT, el PMPS es desplazado de las cisteínas y el Zn rápidamente se une a E6*I, indicando una reacción completamente reversible. Además, como la reversibilidad fue medida en presencia del reactivo PAR, este resultado refuerza la alta constante de afinidad observada para el complejo E6*I-Zn. El agregado de una cantidad estequiométrica de péptido genera el desplazamiento de aproximadamente la mitad del Zn unido al PAR, sugiriendo nuevamente la formación de un dímero de E6*I unido por una molécula de Zn.

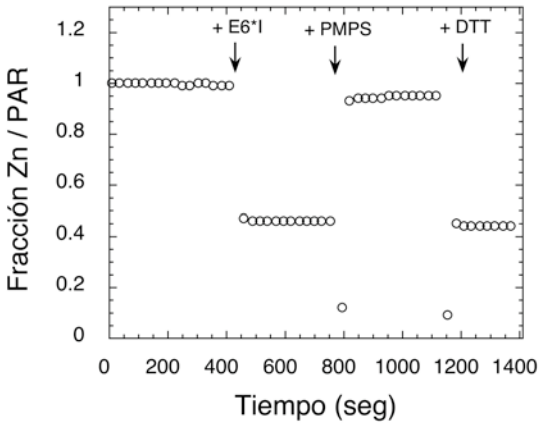


Figura 8. Ensayo de competencia de E6*I con el reactivo PAR. La absorbancia a 500 nm correspondiente al complejo Zn $(PAR)_2$, expresada como Fracción Zn/PAR utilizando una curva estándar de Zn para transformar los datos de absorbancia, fue monitoreada en función del tiempo luego de la adición de una cantidad estequiométrica de E6*I (1μmol E6*I/1μmol Zn). Luego de 5 minutos se agregó 160μM de PMPS y finalmente 250μM de DTT.

Este ensayo también se realizó con la proteína recombinante CI2-E6*I, proteína que como se mencionó en el Capítulo I no posee cisteínas en su secuencia proteica además de las presentes en E6*I; CI2-E6*I extrajo instantáneamente una fracción del metal unido al reactivo PAR (Figura 9B), comportándose como el péptido sintético (Figura 9A). Cuando se utilizó la mutante con sus tres cisteínas mutadas por serinas no hubo desplazamiento del metal del complejo Zn $(PAR)_2$ (Figura 9C), mientras que al utilizar la mutante donde la cisteína 23 se reemplazó por serina se obtuvo el mismo resultado que con la proteína salvaje (Figura 9D). Este resultado indica que la cisteína 23 no es parte de la esfera primaria de coordinación del Zn, apoyando las evidencias obtenidas anteriormente donde las cisteínas 37 y 40 correspondientes a la mitad del motivo de unión

a Zn estarían coordinando el metal a través de la unión con las otras dos cisteínas de una segunda molécula de E6*I.

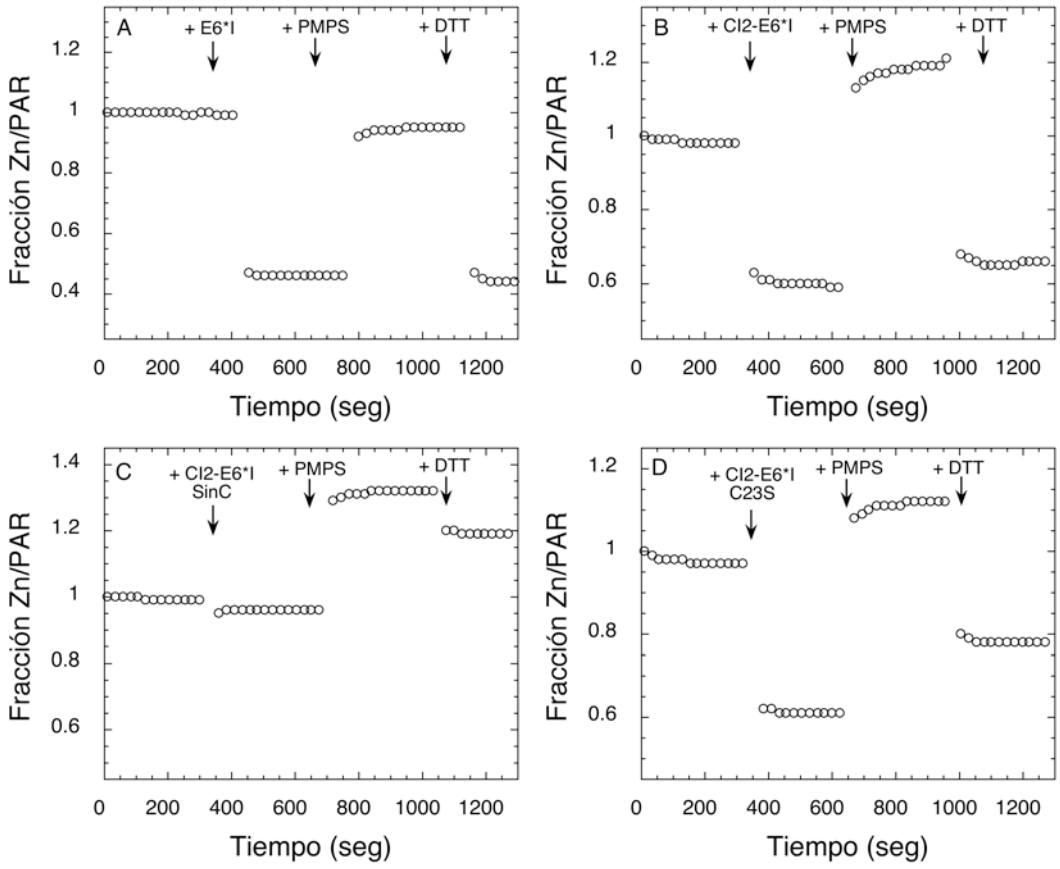


Figura 9. Ensayos de competencia de CI2-E6*I con el reactivo PAR. La absorbancia a 500 nm correspondiente al complejo Zn $(PAR)_2$, expresada como Fracción Zn/PAR utilizando una curva estándar de Zn para transformar los datos de absorbancia,fue monitoreada en función del tiempo luego de la adición de una cantidad estequiométrica de las diferentes proteínas recombinantes (1μmol proteína/1μmol Zn). Luego de 5 minutos se agregó 160μM de PMPS y finalmente 250μM de DTT. **(A)**, E6*I sintético. **(B)**, CI2-E6*I. **(C)**, CI2-E6*ISinC. **(D)**, CI2-E6*IC23S.

Finalmente, para verificar la estequiometria de la unión medida anteriormente por comparación a una curva estándar, y considerando que E6*I posee mayor afinidad por el Zn que el PAR, se realizaron titulaciones con Zn en presencia del reactivo PAR para utilizar como indicador colorimétrico. Brevemente, se agregaron concentraciones crecientes de Zn a una solución con PAR y E6*I y se analizó la absorbancia a 500 nm. Como se muestra en la Figura 10, no hay modificación de la absorbancia a 500 nm hasta que se ocupan todos los sitios de unión a Zn presentes en E6*I, momento en que se comienza a observar un incremento en la absorbancia a 500 nm, indicativo de la

formación del complejo Zn $(PAR)_2$. Este punto de inflexión corresponde a 0.5 moles de Zn por mol de E6*I, confirmando la estequiometria de 2 E6*I:1 Zn medida previamente.

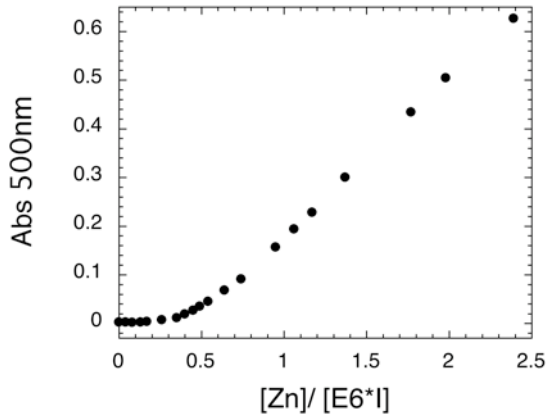


Figura 10. Titulación de E6*I con Zn. Titulación de 100μM de PAR y 6μM E6*I con concentraciones crecientes de Zn. Se graficó la absorbancia a 500 nm, indicativa de la formación del complejo Zn $(PAR)_2$, en función de la relación [Zn]/[E6*I].

Estos ensayos indican que en las condiciones evaluadas, E6*I reconstituye un dominio de unión a Zn a través de la formación de un centro de coordinación de alta afinidad constituido por dos moléculas de péptido, donde las cisteínas 37 y 40 serían los ligandos de la esfera primaria de coordinación del metal.

III.5. E6*I C-TERMINAL.

Previamente mostramos experimentos de oxidación de E6*I medidos en 6.0M Gdm.Cl en presencia de Zn donde se observó que, a diferencia de los medidos en 0.6M Gdm.Cl, en 24 horas se obtiene una fracción de péptido oxidado (Figura 4D). Aunque en el período de tiempo evaluado sólo se oxida un 38.0% del péptido (Tabla I), en condiciones desnaturalizantes el Zn no sería totalmente capaz de proteger a las cisteínas 37 y 40 de la formación del puente disulfuro caracterizado anteriormente.

Este experimento sugiere la existencia de un componente conformacional involucrado en la formación del centro de coordinación de Zn de alta afinidad. Para analizar esta posibilidad se realizaron experimentos con la porción C-terminal de E6*I, $E6*I_{29-53}$, región mínima que contiene los aminoácidos involucrados en la coordinación de Zn. En el capítulo II se mostró que esta región de E6*I conserva la propiedad de modificar sus propiedades conformacionales en presencia de metal indicando que también uniría Zn como E6*I en toda su extensión.

*III.5.1. Análisis del estado redox de E6*I_{29-53}.*

Como ocurre con E6*I, es posible diferenciar claramente mediante RP-HPLC las especies de E6*I_{29-53} totalmente reducida y totalmente oxidada (Figura 11A). Esto permitió realizar cinéticas de oxidación para analizar por esta técnica la tendencia a oxidar de E6*I_{29-53} en presencia y ausencia de Zn y confirmar la unión del metal a este fragmento. El diseño experimental utilizado fue el realizado para E6*I; la tendencia a oxidar de E6*I_{29-53} en ausencia de reductor es alta, con un t ½ de 4.4 horas; esta oxidación también se evita con el agregado de Zn (Figura 11B), resultado esperable dado que E6*I_{29-53} conserva las cisteínas 37 y 40 correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn de E6.

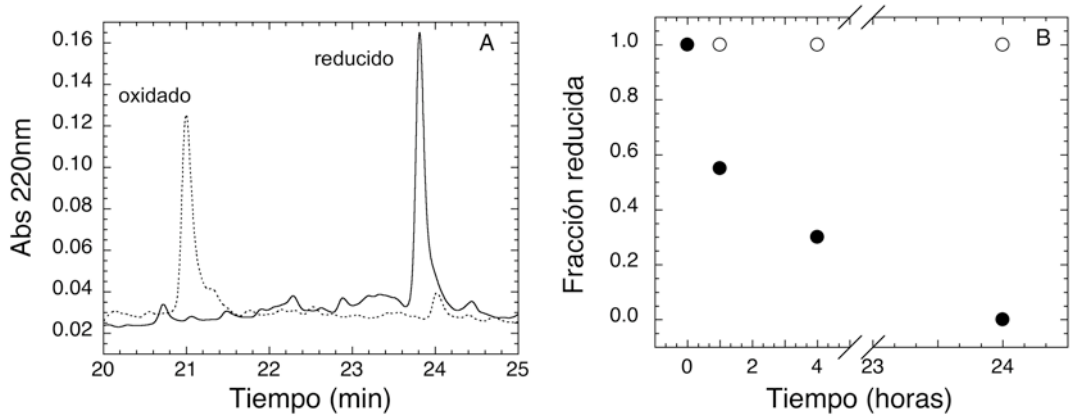


Figura 11. Cinética de oxidación espontánea de E6*I_{29-53} monitoreada por RP-HPLC. **(A)** Perfil de elución de E6*I_{29-53} en columna C18 completamente reducido (línea continua) y completamente oxidado (línea punteada). **(B)** Gráfico de Fracción reducida en función del tiempo de E6*I_{29-53} en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 0.6M Gdm.Cl (circulo negro), y en presencia de 50μM Zn (círculo vacío).

Cuando se comparan las cinéticas de oxidación de E6*I (Figura 4C, D) respecto de E6*I_{29-53} (Figura 11B), donde ambos polipéptidos contienen en su secuencia los residuos involucrados en la formación del puente disulfuro, se observa que la oxidación de E6*I_{29-53} es mucho más lenta que la de E6*I (t ½ de E6*I_{29-53} es 4.4 horas mientras que t ½ de E6*I es 0.3 horas).

*III.5.2. Propiedades de unión a Zn de E6*I_{29-53}.*

En base a la información obtenida por RP-HPLC y lo presentado en el Capítulo II donde se observaron cambios estructurales de E6*I_{29-53} modulados por el Zn, se realizaron varios experimentos para caracterizar las propiedades de la unión de E6*I_{29-53} al metal Zn. Inicialmente, se determinó la estequiometria de la reacción mediante titulaciones con Zn evaluando la unión a través del cambio en estructura secundaria, analizado por DC en el UV lejano (Figura 12A), y de intensidad de fluorescencia de

tirosinas (Figura 12B). Se realizaron curvas de titulación agregando cantidades crecientes de una solución concentrada de Zn a una cubeta conteniendo una concentración fija de E6*I_{29-53} en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, TCEP y 0.6M Gdm.Cl, y se midió la señal deseada una vez alcanzado el equilibrio de la reacción en cada punto de la titulación.

En la Figura 12A se representa el efecto inducido por el Zn en la estructura secundaria de E6*I_{29-53} donde se observa que a medida que se incrementa la concentración del metal la señal alrededor de 225 nm se vuelve más negativa y la señal a 217 nm adquiere valores menos negativos, dando lugar al hombro característico de las especies de E6*I y E6*I_{29-53} cuando se encuentran unidas al Zn (Figura 12A, inserto). Cuando se evalúa la elipticidad a 225 nm en función de la relación molar Zn/ E6*I_{29-53} se observa que la señal decrece hasta un punto donde se estabiliza la señal, correspondiendo a 0.5 moléculas de Zn por molécula de péptido. Por otro lado, este experimento nuevamente muestra que pese a ser un péptido desordenado, sin aparente estructura secundaria canónica, tiene algún tipo de estructura local que se modifica con la adición de Zn.

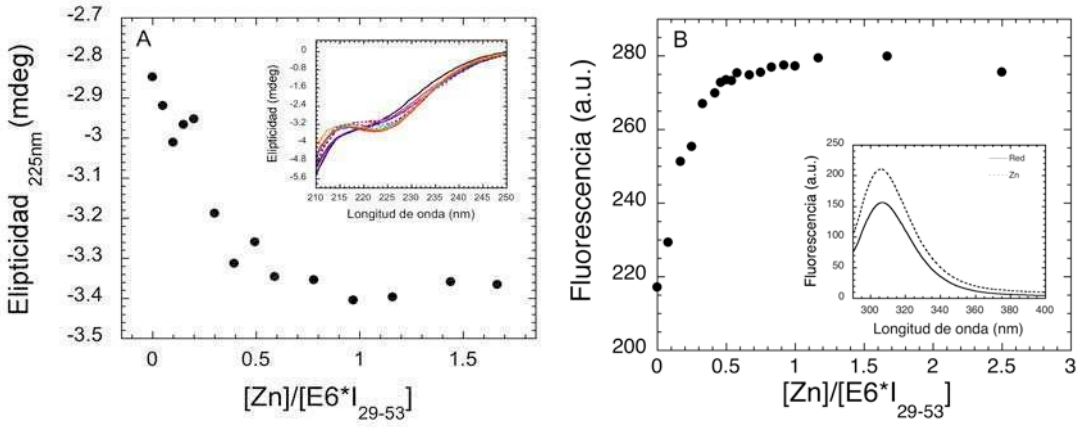


Figura 12. Titulación de E6*I_{29-53} con Zn. **(A)** Titulación de 20μM E6*I_{29-53} con concentraciones crecientes de Zn, analizada por DC. Se graficó la elipticidad a 225 nm en en función de la relación [Zn]/[E6*I_{29-53}]. **Inserto**: espectros de DC en cada punto de la titulación. **(B)** Titulación de 6μM E6*I_{29-53} con concentraciones crecientes de Zn, analizada por emisión de fluorescencia de tirosinas. Se graficó la emisión a 303 nm, luego de excitar a 276 nm, en función de la relación [Zn]/[E6*I_{29-53}]. **Inserto:** Espectro de emisión de fluorescencia de E6*I_{29-53} sin Zn (Red-línea entera) y E6*I_{29-53} con Zn (Zn-línea punteada).

Una de las dos tirosinas presentes en la secuencia de E6*I_{29-53} se encuentra ubicada entre las cisteínas 37 y 40 que forman parte del centro de coordinación de Zn, y reporta la presencia del metal aumentando su emisión de fluorescencia (Figura 12B, inserto). De esta forma, puede ser utilizada para determinar la estequiometría de la reacción mediante titulaciones con el metal. Con este fin, se tituló la muestra con Zn y se

analizó la intensidad de emisión de fluorescencia de las tirosinas excitando a 276 nm y midiendo la emisión a 303 nm en los diferentes puntos evaluados. La adición de cantidades crecientes del metal genera el incremento en la señal, hasta llegar a un valor máximo de emisión de fluorescencia. Este punto de saturación ocurre en 0.5 moléculas de Zn por molécula de E6*I_{29-53}.

Finalmente, el análisis de las titulaciones medidas por dos técnicas diferentes muestra que E6*I_{29-53}, al igual que E6*I, une 0.5 moléculas de Zn por molécula de péptido constituyendo un dímero.

Dado que se demostró por diferentes métodos que E6*I_{29-53} también une Zn, fue de interés evaluar la afinidad de este fragmento por el metal. Con este fin, se realizaron titulaciones con Zn en presencia del indicador colorimétrico PAR midiendo la absorbancia a 500 nm.

Se utilizaron dos modelos de competencia para comparar las afinidades aparentes de ambos péptidos, y en la Figura 13 se encuentran representados los esquemas correspondientes a los dos modelos empleados.

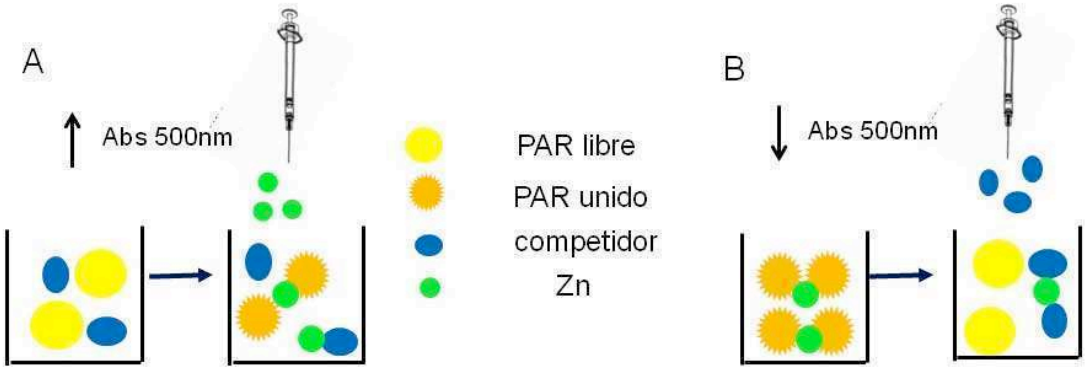


Figura 13. Esquemas que representan los ensayos de competencia realizados. **(A)** Se titula una solución conteniendo PAR y el competidor con concentraciones crecientes de Zn. En este caso, se observa un incremento en la absorbancia a 500 nm correspondiente a la formación del complejo Zn $(PAR)_2$. **(B)** Se titula una solución conteniendo una concentración fija de complejo Zn $(PAR)_2$ con concentraciones crecientes del competidor. En este caso, se observa un descenso en la absorbancia a 500 nm correspondiente a la unión del Zn al competidor desplazando el metal del complejo Zn $(PAR)_2$. Estos experimentos se midieron en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 tanto en 0.6M como en 6.0M Gdm.Cl. Los competidores utilizados fueron E6*I, E6*I_{29-53} y EDTA.

Cuando se realiza el experimento titulando con Zn una solución de PAR y E6*I_{29-53} (Modelo A), se observa que la absorbancia a 500 nm incrementa en forma proporcional a la concentración de Zn agregado indicando que E6*I_{29-53} no puede competir con el PAR para captar el metal (Figura 14A-círculos vacíos). La presencia de E6*I_{29-53} no interfiere con la unión del Zn al PAR, confirmando la imposibilidad de esta porción de la molécula

de competir con el reactivo por el metal. En cambio, como se mostró anteriormente, con el péptido entero se observa que el PAR comienza a unir Zn solo luego de que se ocuparon todos los sitios de unión a metal presentes en E6*I (Figura 14A-círculos negros). Este experimento sugiere una afinidad diferencial entre ambas moléculas, donde claramente E6*I es más afín por el metal que su fragmento C-terminal, E6*I_{29-53}.

Posteriormente, se tituló una solución de PAR y Zn con E6*I_{29-53} reducido y desplegado (Modelo B), y a diferencia de lo observado para E6*I (Figura 14B-círculos negros), E6*I_{29-53} compite de manera muy débil con el PAR extrayendo sólo una proporción de metal (Figura 14B-círculos vacíos). E6*I se comporta como el quelante de metales EDTA (Figura 14B-cuadrados negros), cuya constante de afinidad por el metal es del orden de 10^{-14} M (*156*), indicando como vimos anteriormente que la afinidad de E6*I es órdenes de magnitud mayor a la afinidad del PAR.

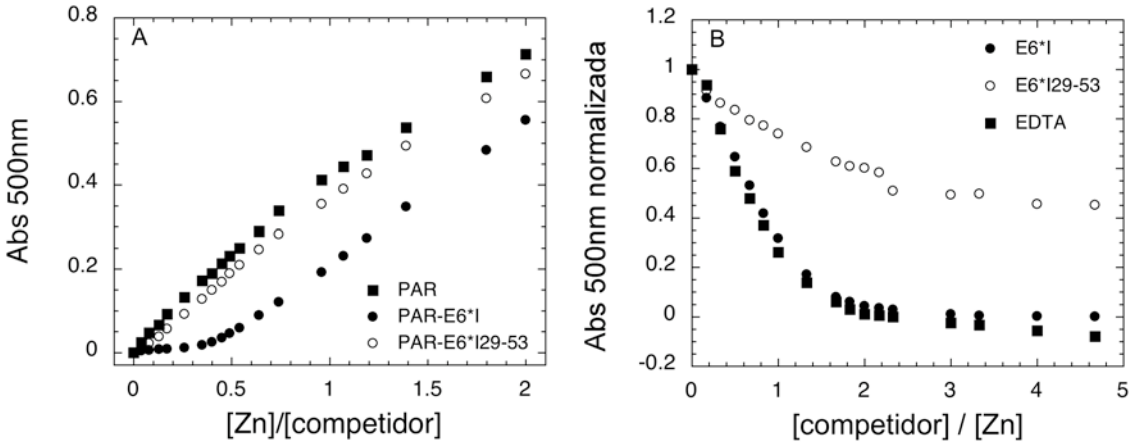


Figura 14. Ensayos de competencia con el reactivo PAR en 0.6M Gdm.Cl. Las titulaciones se realizaron en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 0.6M Gdm.Cl, 2.0mM TCEP. **(A)** Titulación de 6μM del competidor y 100μM de PAR con concentraciones crecientes de Zn, evaluando la absorbancia a 500 nm, indicativo de la formación del complejo Zn $(PAR)_2$. **Competidores:** E6*I_{29-53} (circulo vacío), E6*I (círculo negro) y PAR solo (cuadrado negro). **(B)** Titulación de 3μM Zn y 100μM de PAR con concentraciones crecientes de competidor, evaluando la absorbancia a 500 nm. **Competidores:** E6*I_{29-53} (circulo vacío), E6*I (circulo negro) y EDTA (cuadrado negro).

En conjunto, los resultados obtenidos por HPLC y por competencia con el reactivo PAR, donde E6*I tiene mayor afinidad por el Zn que E6*I_{29-53}, sugieren la existencia de algún componente conformacional o la necesidad de algún otro ligando presente en la porción N-terminal de E6*I para conformar una especie con alta afinidad por el metal.

Por este motivo, los experimentos descriptos previamente también se realizaron en 6.0M Gdm.Cl permitiéndonos evaluar si la pérdida de algún componente conformacional

modificaba sustancialmente la afinidad de E6*I por el Zn. Se observó que en el modelo de competencia donde se agrega metal a una solución con PAR y proteína (Modelo A), ahora E6*I se comporta como el fragmento C-terminal, no pudiendo competir con el reactivo PAR para captar el Zn que se incorpora en la reacción (Figura 15A); esto indica la pérdida de interacciones no covalentes estabilizantes, posiblemente de largo alcance, involucradas en la formación del centro de coordinación de alta afinidad.

Al analizar la titulación donde se agrega E6*I concentrada y desnaturalizada a una solución con Zn y PAR en 6.0M Gdm.Cl (Modelo B), también se observa que la presencia de altas concentraciones del agente desnaturalizante afecta la afinidad de E6*I por el Zn, disminuyéndola (Figura 15B, cuadrados negros), aunque no lo suficiente como para comportarse como E6*I_{29-53}. Por el contrario, en estas condiciones la porción C-terminal de E6*I, E6*$I_{29-53,}$ no parece modificar su comportamiento por la presencia de Gdm.Cl (Figura 15B). Cabe destacar que la coordinación de Zn no se ve afectada por Gdm.Cl, dado que el PAR continúa uniendo el metal aún en altas concentraciones del desnaturalizante. También es importante mencionar que tanto por HPLC como por DC, se observó que en 6.0M Gdm.Cl el metal se encuentra unido a E6*I, indicando que el Gdm.Cl solo no rompe la interacción del metal.

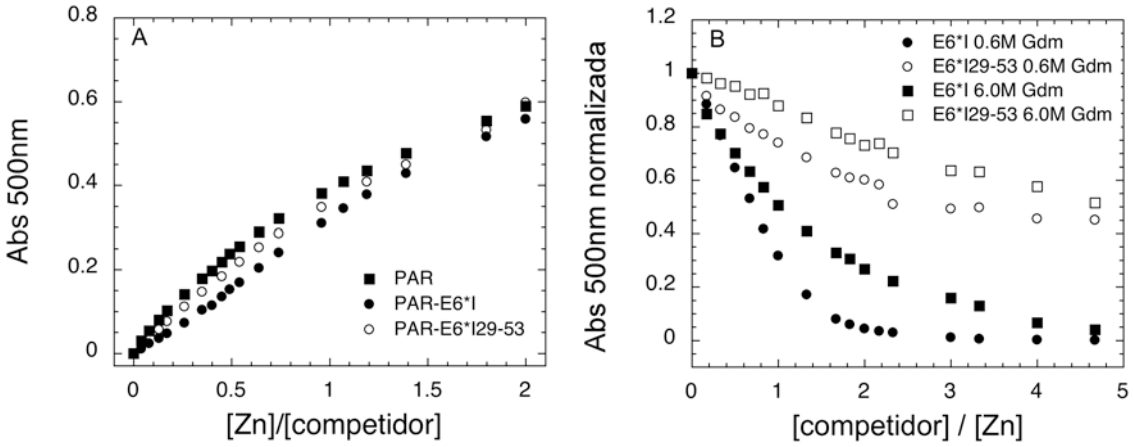


Figura 15. Ensayos de competencia con el reactivo PAR en 6.0M Gdm.Cl. Las titulaciones se realizaron en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 6.0M Gdm.Cl, 2.0mM TCEP. **(A)** Titulación de 6μM del competidor y 100μM de PAR con concentraciones crecientes de Zn, evaluando la absorbancia a 500 nm, indicativo de la formación del complejo Zn $(PAR)_2$. **Competidores:** E6*I_{29-53} (circulo vacío), E6*I (círculo negro) y PAR solo (cuadrado negro). **(B)** Titulación de 3μM Zn y 100μM de PAR con concentraciones crecientes de competidor, evaluando la absorbancia a 500 nm. **Competidores:** E6*I_{29-53} (cuadrado blanco) y E6*I (cuadrado negro). También se graficaron las curvas obtenidas en 0.6M Gdm.Cl (Figura 14B); E6*I_{29-53} (círculo blanco) y E6*I en 0.6M Gdm.Cl (círculo negro).

En esta sección determinamos que el extremo C-terminal de E6*I contiene la información necesaria para reconstituir el dominio de unión a Zn presente en la proteína E6. E6*I_{29-53} posee en su secuencia los residuos correspondientes a la mitad del dominio de unión a Zn y también forma un dímero mediado por la unión a este metal, aunque en este caso la coordinación es órdenes de magnitud menos afín que la observada para E6*I entera. A través de diferentes ensayos de competencia determinamos que la porción N-terminal de E6*I es fundamental para alcanzar la máxima afinidad, indicando que aunque en esta especie de E6*I no se observan características de estructura secundaria canónicas, se forman estructuras estables no canónicas que estabilizan la unión al metal.

En conjunto, todos los resultados de esta sección indican que E6*I dimeriza para constituir un centro de coordinación de Zn de alta afinidad que requiere de la porción N-terminal de la molécula para alcanzar la máxima afinidad.

III.6 DISCUSIÓN.

La alta conservación de los residuos cisteínas en E6*I, sumada a su alta representación, nos llevaron a evaluar la relevancia de estos residuos en el contexto de E6*I. La reactividad de este aminoácido lo hace el aminoácido menos abundante en las proteínas después del triptófano y en general, su presencia indica una relevancia estructural, funcional o regulatoria (*157*).

En este capítulo se evaluó el rol de las cisteínas en las propiedades conformacionales de E6*I. Mediante la técnica de RP-HPLC se observó que la tendencia de este péptido a oxidar es alta con un t ½ de 0.3 horas y por espectrometría de masas se determinó que los aminoácidos involucrados en la oxidación eran las cisteínas vecinas C37 y C40, correspondiendo a la mitad del motivo de unión a Zn altamente conservado en estas proteínas. Se midió el potencial redox de esta reacción obteniendo un valor de -0.254V, en el orden de proteínas oxireductasas como la tioredoxina (*154*). Dado que la especie oxidada precipita más que la especie reducida, el potencial redox se midió en 6.0M Gdm.Cl. En proteínas, el potencial de oxidación en el estado desplegado respecto al del estado plegado puede variar; ejemplos de esto son las proteínas oxireductasas tioredoxina y DsbA donde ambas proteínas tienen el mismo potencial en el estado desplegado y luego de plegarse adquieren valores opuestos, coherentes con la función que ejercen sus puentes disulfuros. La tioredoxina tiene alta tendencia a oxidarse reduciendo a las proteínas con las que interactúa mientras que DsbA tiende a estar

reducida, oxidando a sus blancos. Por el contrario, en el caso de péptidos pequeños el potencial redox está determinado por la distancia entre las cisteínas que se oxidan y la secuencia que las rodea, por lo que la determinación del potencial de E6*I en el estado desplegado no debería diferir de lo que ocurre en el estado plegado (*154*). Además, vimos que la tendencia a oxidar en 0.6M Gdm.Cl comparada con 6.0M Gdm.Cl no difiere significativamente (t ½ 0.3 y t ½ 1.1 horas, respectivamente).

La secuencia aminoacídica de E6*I corresponde a la mitad de un dominio independiente de plegamiento de la proteína E6 entera, cuyos dominios N-terminal y C-terminal son dominios *Zn finger* donde el metal es parte estructural de estos dominios. Dado que en E6*I se interrumpe un motivo de coordinación de Zn, manteniendo sólo dos de sus cuatro ligandos de coordinación, fue de interés analizar el papel que juega el metal en el contexto de este péptido. En el capítulo I se mostró que E6*I une Zn modificando su estructura secundaria y grado de oligomerización; en este capítulo se abordó la caracterización por métodos analíticos definiendo la estequiometria de la reacción, donde se obtuvo una molécula de Zn cada dos moléculas de E6*I lo que indica la formación de un dímero mediado por una molécula de Zn.

Por otra parte, análisis de RP-HPLC muestran que el Zn impide la oxidación de las cisteínas del motivo CxxC, confirmando que estos residuos están involucrados en la coordinación del metal.

Los ensayos de competencia con el indicador colorimétrico PAR muestran que E6*I puede extraerle el Zn inmediatamente, experimento que sugiere que la afinidad de E6*I por este metal es mayor a la del reactivo PAR (K_D de 10^{-12} M) (*155*). Asimismo, podemos inferir que la constante es al menos dos órdenes de magnitud mayor a la del PAR, ya que en ensayos de competencia se comporta como el quelante de metales EDTA (K_D de 10^{-14} M) (*156*). Este valor se encuentra en el orden de proteínas bien documentadas que coordinan Zn en un contexto celular (*158*). Dadas las concentraciones extremadamente bajas de Zn libre dentro de una célula (*159*), este dato es de extrema importancia para sugerir que el fenómeno aquí descripto puede ocurrir en un contexto biológico.

Los experimentos realizados en este capítulo, en conjunto con las observaciones realizadas en los capítulos I y II, muestran que la unión a metal es un proceso más complejo que la simple interacción de cuatro ligandos con el Zn.

El comportamiento complejo asociado a las cisteínas del motivo CxxC puede evaluarse considerando tres factores diferentes que se encuentran inter-relacionados; por

un lado la tendencia a oxidar de las cisteínas vecinas C37 y C40, por otro lado la unión a metal en esta región del péptido, y finalmente las modificaciones conformacionales inducidas por el Zn y previamente detalladas en los capítulos I y II.

En la siguiente tabla (Tabla II) se resumen los resultados obtenidos de los experimentos realizados de manera comparativa entre los péptidos E6*I y E6*I_{29-53}; como mencionamos previamente, este último péptido corresponde al extremo C-terminal de E6*I, región mínima que contiene el motivo de unión a Zn CxxC.

Tabla II. Análisis comparativo entre los péptidos E6*I y E6*I_{29-53}. Se indican los resultados obtenidos para ambos péptidos respecto de la oxidación de las cisteínas y la unión a Zn.

Péptido	Gdm.Cl (M)	Zn	t ½ (horas)[a]	% oxi $_{24hs}$	Unión a Zn[b]
E6*I	0.6	+	Nd[c]	0	Alta
		-	0.3	100	-
	6.0	+	36.7	38.0	Baja
		-	1.1	100	-
E6*I_{29-53}	0.6	+	Nd[c]	0	Baja
		-	4.4	100	-
	6.0	+	Nd[c]	0	Baja
		-	4.1	100	-

[a] obtenido de las cinéticas de oxidación analizadas por RP-HPLC.
[b] se utilizó "alta" y "baja", considerando los experimentos de competencia con el reactivo PAR (Figuras 14 y 15).
Nd[c] No se observó oxidación en el tiempo de incubación del experimento.

En primer lugar, se observa que la presencia de Zn inhibe la oxidación de las cisteínas del CxxC tanto en E6*I como en E6*I_{29-53}, demostrando nuevamente que ambos péptidos unen metal. Al igual que E6*I, E6*I_{29-53} une Zn con una estequiometria 0.5:1, indicando la formación de un dímero. La oxidación y la unión al metal ocurren en los mismos residuos, y el Zn modula la formación del puente disulfuro entre las cisteínas vecinas 37 y 40.

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de algún efecto conformacional que regula la afinidad por el Zn y con ello, la tendencia a oxidar de las cisteínas. Así, E6*I en 0.6M Gdm.Cl tiene alta afinidad por el metal (K_D>>10^{-12}M) y baja tendencia a oxidar (en

24 horas no se observa péptido oxidado), mientras que en 6.0M Gdm.Cl su afinidad por el Zn disminuye al menos dos órdenes de magnitud y se incrementa su tendencia a oxidar (t ½ 36.6 horas), obteniéndose en estas condiciones un 38.0% de péptido oxidado. Por el contrario, en el caso de E6*I_{29-53} la realización de los experimentos en 6.0M Gdm.Cl no modifica ni la afinidad por el metal, que es menor a la de E6*I, ni la tendencia a oxidar (Tabla II).

Un aspecto importante a evaluar es qué determina la afinidad por el metal. Es claro que el determinante primario es el par de cisteínas del CxxC, ya que su oxidación o reemplazo por serinas inhibe completamente la unión del péptido al Zn. Sin embargo, los resultados descriptos previamente donde la presencia de 6.0M Gdm.Cl disminuye la afinidad de E6*I por el metal, indican la existencia de un componente conformacional que regula la afinidad más allá de la secuencia lineal. A su vez, la eliminación de los primeros 25 residuos (péptido E6*I_{29-53}) también disminuye significativamente la afinidad por el Zn.

Una observación controversial es el hecho de que el péptido E6*I_{29-53} oxida más lento que el péptido E6*I (E6*I t ½ 0.3 horas vs E6*I_{29-53} t ½ 4.4 horas), dado que consideramos que esta reacción es local y restringida al CxxC presente en la secuencia de los dos péptidos. Una explicación probable a esta observación es que la C23, ubicada en la porción N-terminal de E6*I y ausente en E6*I_{29-53}, catalice la reacción de oxidación.

Finalmente, los experimentos de competencia con el reactivo PAR confirman la existencia de un componente conformacional asociado a la presencia del N-terminal de E6*I para formar un centro de coordinación de Zn de alta afinidad, y reconstituir, aunque con distinta estructura, el dominio de unión a Zn presente en la proteína E6 entera.

Como mencionamos previamente, las concentraciones disponibles de Zn libre intracelulares son muy bajas, del orden de subnanomolar o fentomolar (*159*). Existen múltiples mecanismos celulares que mantienen estos valores tan bajos, permitiendo a este metal actuar como un regulador en la célula. Dada la alta afinidad observada para la unión E6*I-Zn, es posible considerar que la proteína una el metal en un contexto fisiológico, y que éste constituya un mecanismo de regulación importante del efecto de E6*I en la célula. Como observamos en los capítulos I y II, el metal tiende a mantener el péptido en una estructura extendida, sin estructura secundaria canónica aparente. Esta característica tiene reminiscencia con los dominios IDPs, cuyas estructuras dinámicas generan la adaptabilidad a múltiples blancos (*143*), permitiendo suponer que esta conformación en E6*I también favorecerá la interacción con blancos celulares y tal vez virales, ejerciendo de este modo sus diversos efectos. Además, la oxidación y la unión a

metal están relacionadas y dado que ocurren sobre los mismos residuos, pueden actuar como un mecanismo de encendido y apagado para ejercer su efecto biológico.

CAPÍTULO IV:
Mecanismo de acción de E6*I y Generación de anticuerpos monoclonales

Como se describió en la introducción, existen dos líneas fundamentales de trabajo que describen efectos de E6*I como proteína en un contexto celular. Estos efectos se basan, principalmente, en inhibir la actividad de la oncoproteína E6 de la que deriva, constituyendo un punto de regulación fina de la función de E6.

La primera línea está relacionada con el supresor tumoral p53, uno de los principales blancos de la proteína E6. Este grupo demostró que E6*I HPV18 tiene un efecto anti-proliferativo en células naturalmente transformadas por HPV y correlaciona con la habilidad de este péptido de inhibir la degradación de p53 mediada por E6 tanto *in vitro* como *in vivo* (*96*). El mecanismo que mediaría este efecto es la interacción directa de E6*I con las proteínas E6 y E6AP; mutantes que inhiben la interacción con E6 son incapaces de inhibir la proliferación de la línea celular (*97*). Además, observaron una dependencia de la modulación de las funciones de E6 con el ciclo celular, dado que los niveles de expresión de E6*I varían con el ciclo celular, siendo mayores en G2/M, mientras que los de E6 permanecen constantes. Esta variación en las concentraciones relativas de ambas proteínas se traduce en cambios en los niveles de p53 observados en la célula y con ello, en el nivel de inducción de la apoptosis (*98*).

Estudios más recientes muestran que E6 HPV16 puede inhibir la muerte celular programada inducida por factores extrínsecos como TNF y Fas a través de la interacción con el receptor de TNF 1, FADD y procaspasa 8 (*94, 100, 101, 160*). Esta vía constituye otro medio por el cual la inhibición de las funciones de E6 por parte de E6*I, conducen a la apoptosis. En este proceso, hay una fuerte dependencia del efecto observado con la concentración absoluta y relativa de ambas moléculas indicando una complejidad mayor en el sistema. A bajas concentraciones de proteína E6 se inhibe la muerte celular programada inducida por factores extrínsecos, mientras que en niveles mayores de expresión de E6 y E6*I se observa la sensibilización frente a la inducción de apoptosis por parte del factor TNF. Esto se debe a la formación de un complejo de señalización de proteínas celulares que incluye a las proteínas E6 y E6*I (denominados *Pseudo*-DISC) que permite transmitir la señal apoptótica y esto sólo ocurre en presencia de ambas proteínas virales (*103*).

Por los motivos aquí descriptos, resulta fundamental evaluar las respuestas y efectos celulares considerando las concentraciones relativas de ambas proteínas. Estas dos líneas principales se basan en la interacción directa E6*I/E6 para obtener un efecto claro y antagónico de E6*I sobre E6. Esto constituye un ejemplo respecto de que en virus, como también ocurre en células eucariotas, las variantes obtenidas por

procesamiento alternativo se expresan y pueden tener efectos biológicos opuestos al de las proteínas de la que derivan (*129*).

En base a los conocimientos adquiridos a partir de la caracterización de E6*I presentada en los capítulos anteriores, donde estudiamos la relevancia de las cisteínas y el Zn en las propiedades conformacionales de este péptido, sumada a la información celular obtenida de bibliografía, proponemos una hipótesis del modelo de acción de E6*I: este modelo se basa en la formación de hetero-complejos entre ambas proteínas. Puede existir competencia entre ambas moléculas por el Zn unido a E6 o por las cisteínas del hemi-sitio de esta proteína que, junto con el CxxC presente en E6*I, reconstituirían el dominio de unión a Zn presente en E6 entera. Dado que hay competencia entre ambas moléculas, el efecto es dependiente de la concentración relativa de estas dos proteínas.

Una posibilidad que surge de este modelo es que E6*I actúe como un quelante específico del Zn unido a E6 entera. Este mecanismo de inhibición de la actividad de la oncoproteína E6 se mostró previamente con una serie de compuestos orgánicos utilizados para expulsar el Zn unido a E6. Uno de ellos, denominado C16 (*4,4-dithiodimorpholine*), fue eficaz en remover especificamente el metal unido a la proteína E6 dentro de la célula, interfiriendo de este modo con la actividad de degradación de p53 mediada por la oncoproteína (*161*). La inactivación específica de proteínas *Zn finger* del tipo CCHC con compuestos químicos también fue demostrada para la proteína de la nucleocápside p7 (Ncp7), componente del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) (*162, 163*) y para PARP (*poly-adenosine diphosphate ribose polymerase*) (*164*). Ciertos compuestos basados en enlaces disulfuros y otros compuestos orgánicos capaces de experimentar reacciones redox que lleven a la liberación pasiva del Zn unido al centro de coordinación, actuan selectivamente sobre los átomos de azufre de las cisteínas que coordinan Zn en NCp7. Uno de estos compuestos que expulsa el Zn de NCp7, azodicarbonamida, se encuentra en pruebas clínicas contra instancias avanzadas de la enfermedad del sídrome de la inmunodeficiencia humana (SIDA) (*165*).

Son varios los ejemplos donde se describe la interacción directa entre E6*I y E6 como requisito para observar un efecto celular de la variante obtenida por procesamiento alternativo, E6*I. En el laboratorio contamos con ambas proteínas para trabajar *in vitro* además de un amplio conocimiento del comportamiento en solución tanto de la proteína E6 como de E6*I, siendo complejo para ambas. De hecho,

mostramos la tendencia de las dos proteínas a homo-oligomerizar *in vitro* (*75, 130*). Por otro parte podrían ocurrir hetero-oligomerizaciones que le permitan a E6*I ejercer su función. La formación de hetero-oligómeros ya fue propuesta anteriormente para la proteína E6, y E6*I puede ser parte de esas estructuras. Considerando estos antecedentes, se procedió a analizar la existencia de interacción directa entre las proteínas E6 y E6*I de la cepa HPV16 como requisito para el desarrollo del posible mecanismo de acción de E6*I.

IV.1. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DIRECTA ENTRE LAS PROTEÍNAS E6 Y E6*I.

*IV.1.1. Interacción de E6 y E6*I analizada por gel (far western).*

Toda la información obtenida a lo largo de esta tesis respecto a la tendencia del péptido E6*I a formar oligómeros solubles en insolubles y a su dificultad de trabajarlo en solución, junto con el conocimiento existente sobre la proteína E6, dificultan la realización de técnicas convencionales de análisis de interacción *in vitro* entre dos proteínas en solución, como métodos espectroscópicos o colorimétricos. Considerando estas observaciones, evaluamos la interacción utilizando un experimento que se basa en los principios del *western blot* y permite detectar interacción entre dos proteínas distintas a un anticuerpo.

El desarrollo metodológico se encuentra explicado en detalle en la sección de Materiales y Métodos. Brevemente, se corrieron geles desnaturalizantes SDS-PAGE con aquellas proteínas con las que se quería analizar interacción, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y luego de bloquear la membrana, se la incubó con diferentes diluciones de E6*I conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). De esta manera, en aquellos sitios donde se une E6*I-FITC se obtiene una señal fluorescente que puede visualizarse fácilmente.

Inicialmente, en el SDS-PAGE se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína E6 HPV16 y como control negativo las proteínas ovoalbúmina y E7 HPV16; como se mencionó previamente en esta tesis, en bibliografía se sugiere que las proteínas E6 y E7 surgieron por duplicación génica y poseen un ancestro común (*57, 58*). Ambas comparten el motivo $CxxCx_{29}CxxC$ de unión a Zn, y la estructura de estos motivos de Zn es única respecto del resto de las proteínas de unión a Zn conocidas (*166*). En base a esto y considerando nuestra hipótesis de trabajo, que presume una

interacción directa entre E6 y E6*I mediante por ejemplo la región de unión a Zn, E7 constituye un excelente control para evaluar la especificidad de la interacción.

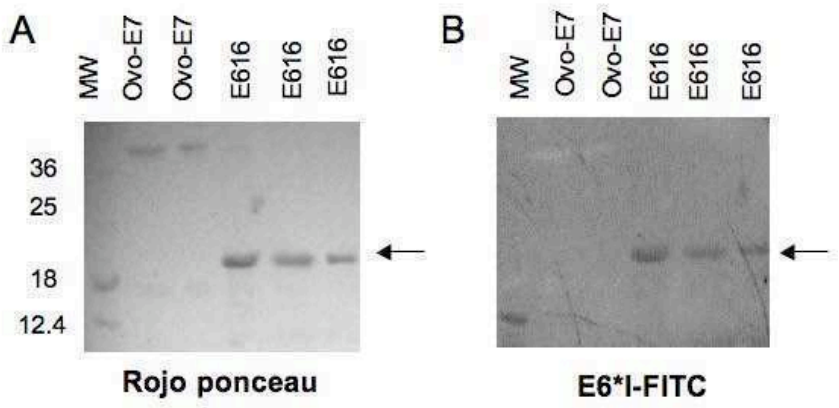


Figura 1. Interacción directa entre las proteínas E6 y E6*I HPV16 analizada por la técnica de *far western blot*. Las proteínas E6HPV16, E7HPV16 y ovoalbúmina se separaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa**. (A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(B)** membrana que se incubó con una dilución de E6*I-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*.

Cuando se agrega E6*I-FITC a una membrana donde se transfirieron las proteínas de interés (Figura 1A-*Rojo Ponceau*), se observa que en aquellos sitios donde se encuentra E6 se obtiene una banda que indica la interacción de E6*I con E6 (Figura 1B). También se observa señal en la proteína del *marker* Citocromo C, correspondiendo a una señal de auto-fluorescencia. En el resto de las proteínas evaluadas no se obtuvo señal, demostrando la especificidad del ensayo. Cabe destacar que la banda tenue de la proteína E7 (Figura 1A-*Rojo Ponceau*) no implica una menor masa de esta proteína; previamente se demostró una menor tinción de esta molécula con diferentes colorantes.

La proteína E6*I actúa como un ligando específico reconociendo sólo aquellas proteínas con las que interactúa. La utilización de este diseño experimental nos permitió observar que E6*I interactúa específicamente con E6 de HPV16, y no así con la proteína E7 perteneciente al mismo tipo viral.

Posteriormente se evaluó la capacidad de E6*I de reconocer a la proteína E6 dentro de una mezcla compleja de diferentes proteínas. Con este fin, se utilizó la proteína E6 HPV16 dentro de un lisado de bacterias (Figura 2A-*Rojo ponceau*) y se observó que E6*I también la reconoce en este contexto (Figura 2B). Este resultado demuestra la especificidad de la reacción y refuerza la hipótesis de la existencia de

una interacción directa entre las proteínas E6 y E6*I del tipo viral HPV16, tal como ocurre con las proteínas de HPV18.

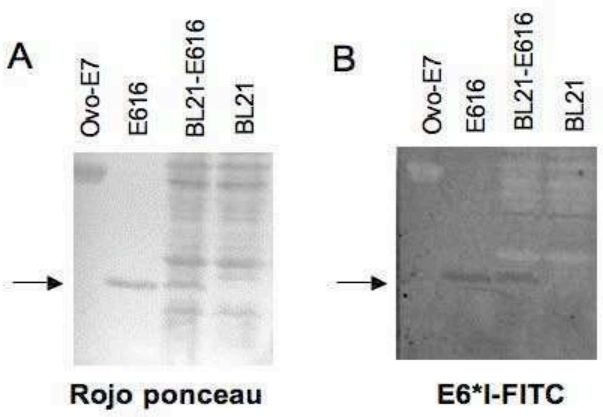


Figura 2. E6*I reconoce específicamente a la proteína E6 dentro de un lisado de bacterias. Lisado de bacterias *E Coli*, lisado que expresa la proteína E6HPV16, E6HPV16 como control positvo y E7HPV16 y ovoalbúmina, utilizadas como control negativo, se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **(A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(B)** Membrana que se incubó con una dilución de E6*I-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*.

Considerando los resultados obtenidos en el Capítulo III respecto de la relevancia de las cisteínas en las propiedades conformacionales de E6*I y el modelo de acción propuesto, quisimos analizar si la interacción con E6 ocurría a través de la formación de un hetero-dímero unido por Zn o a través de oxidaciones intermoleculares entre cisteínas de ambas moléculas.

Con este fin, en primer lugar se incubó la membrana conteniendo las proteínas E6HPV16, E7 HPV16 y ovoalbúmina, con E6*I en presencia y ausencia de metal; en este último caso se agregó EDTA a todas las soluciones utilizadas (Figura 3).

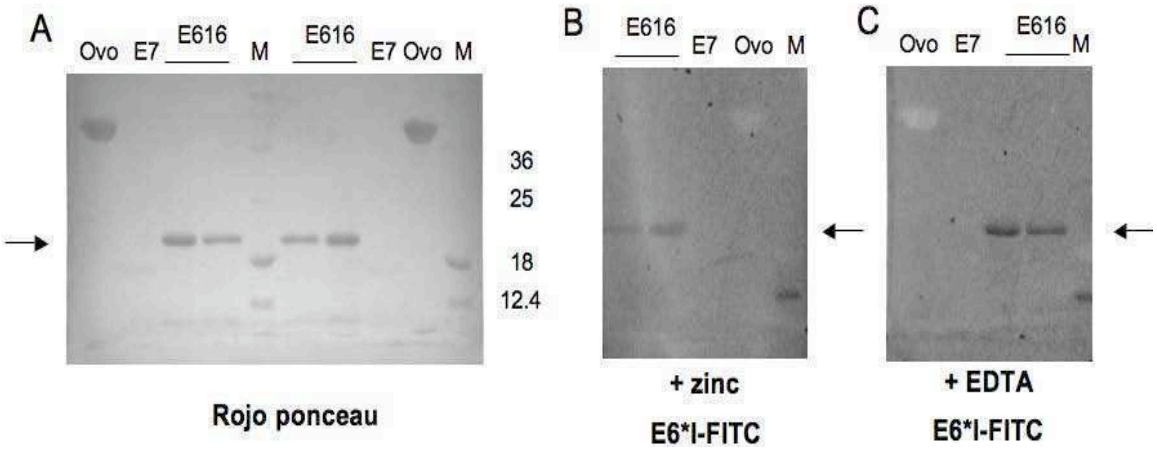


Figura 3. Relevancia del Zn en la interacción directa entre las proteínas E6*I y E6. Las proteínas E6HPV16 y E7HPV16 y ovoalbúmina, utilizadas como control negativo, se separaron en un gel SDS-

PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con una dilución de E6*I-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*. **(A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(B)** incubación en presencia de Zn. **(C)** incubación en presencia de EDTA.

En la Figura 3 se observa que E6*I reconoce específicamente a la proteína E6 tanto en presencia (Figura 3B) como en ausencia de Zn (con EDTA-Figura 3C) indicando que la ausencia del metal, en las condiciones evaluadas, no impide la interacción entre ambas proteínas.

Posteriormente, con el objetivo de analizar el posible requerimiento de oxidaciones intermoleculares entre cisteínas de E6*I y E6 para que ocurra la interacción, se incubó a la proteína E6 con iodoacetamida para bloquear todas las cisteínas presentes en la molécula. Se corrió el gel, se transfirió a la membrana de nitrocelulosa y se la incubó con E6*I. Como se observa en la Figura 4, este tratamiento tampoco afectó la interacción entre ambas moléculas.

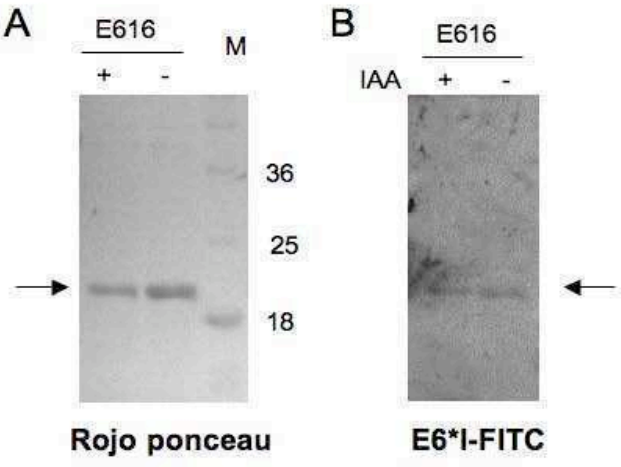


Figura 4. Relevancia de las cisteínas de E6 en la interacción directa entre las proteínas E6*I y E6. Las proteínas E6HPV16 con y sin tratamiento con iodoacetamida se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **(A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(A)** Membrana que se incubó con una dilución de E6*I-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*.

Los resultados obtenidos indican que en las condiciones evaluadas y bajo este diseño experimental, el Zn y las oxidaciones intermoleculares no serían pre-requisitos para que ocurra la asociación entre E6 y E6*I de HPV16.

*IV.1.2. Interacción de E6 y E6*I$_{29\text{-}53}$ analizada por far western.*

Habiendo demostrado la existencia de interacción directa entre las proteínas E6 y E6*I, posteriormente decidimos acotar el sitio de interacción analizando la porción C-terminal de E6*I. En los capítulos II y III mostramos que muchas de las propiedades

conformacionales de E6*I están restringidas a esta región de la molécula, además de contener la mitad del motivo de unión a Zn CxxC, por lo que en esta sección se evaluará si E6*I_{29-53} conserva la propiedad de interactuar específicamente con la proteína E6 HPV16.

Se utilizó el mismo diseño experimental descripto previamente, pero en este caso se incubó con E6*I_{29-53} marcada con FITC. En la Figura 6B se muestra el revelado de la membrana que se incubó con E6*I_{29-53}-FITC y se observa la presencia de señal en la proteína E6 y ausencia en las proteínas E7 HPV16 y ovoalbúmina, además de las proteínas del *marker*, utilizadas como control negativo. Este resultado indica que la porción C-terminal de E6*I también interactúa con E6 HPV16 de manera específica.

Además, se evaluó la interacción con la proteína E6 del tipo viral de bajo riesgo HPV11. Se observó señal fluorescente sobre la proteína E6 HPV11 indicando la unión del péptido a esta proteína. Cabe destacar que es esperable observar asociación también con E6 HPV11, ya que son proteínas homólogas. Sin embargo, la interacción se ve disminuida dado que aunque en la Figura 5A se observa una mayor señal en E6 HPV11 que en la proteína E6 HPV16, correspondiente a una cantidad mayor de proteína, la señal fluorescente es menor (Figura 5B). Esto sugiere una menor afinidad del péptido E6*I_{29-53} HPV16 por la proteína E6 HPV11, indicando la especificidad de la interacción por el mismo tipo viral.

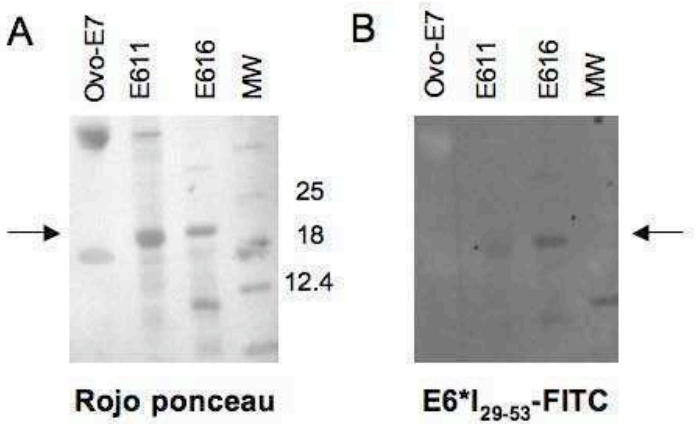


Figura 5. Interacción directa entre la proteína E6 y el péptido E6*I_{29-53} HPV16 analizada por la técnica de *far western blot*. Las proteínas E6HPV16, E7HPV16 y ovoalbúmina se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **(A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(B)** Membrana que se incubó con una dilución de E6*I_{29-53}-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*.

Por otra parte, E6*I_{29-53} mantiene la capacidad de reconocer a la proteína E6 en el contexto de un lisado bacteriano (Figura 6B), demostrando nuevamente una alta especificidad.

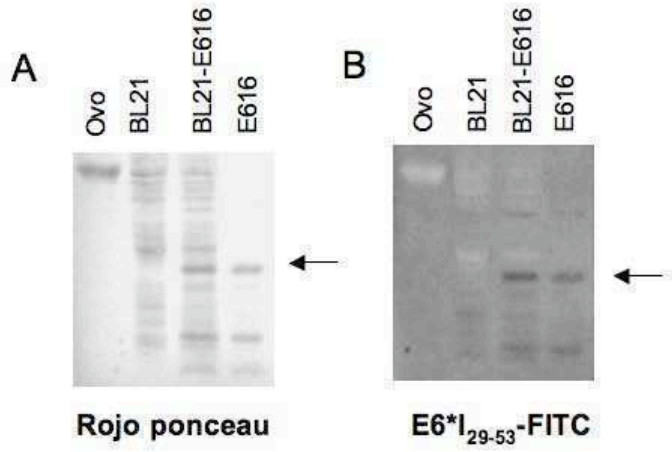


Figura 6. E6*I_{29-53} reconoce específicamente a E6 dentro de un lisado de bacterias. Lisado de bacterias *E Coli*, lisado que expresa la proteína E6HPV16, E6HPV16 como control positivo y E7HPV16 y ovoalbúmina, utilizadas como control negativo, se separaron en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa **(A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(B)** Membrana que se incubó con una dilución de E6*I_{29-53}-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*.

Finalmente y considerando que E6*I_{29-53} contiene en su secuencia la mitad del motivo de unión a Zn y las propiedades de unir este metal, aunque con menor afinidad, evaluamos el requerimiento del Zn en la interacción directa con E6 (Figura 7). Como se realizó con el péptido E6*I entero, para evaluar la relevancia del Zn, las membranas se incubaron en presencia de Zn (Figura 7B) o en ausencia de metal, conteniendo en este último caso EDTA (Figura 7C). Independientemente de la solución de incubación, E6*I_{29-53} reconoce específicamente a la proteína E6.

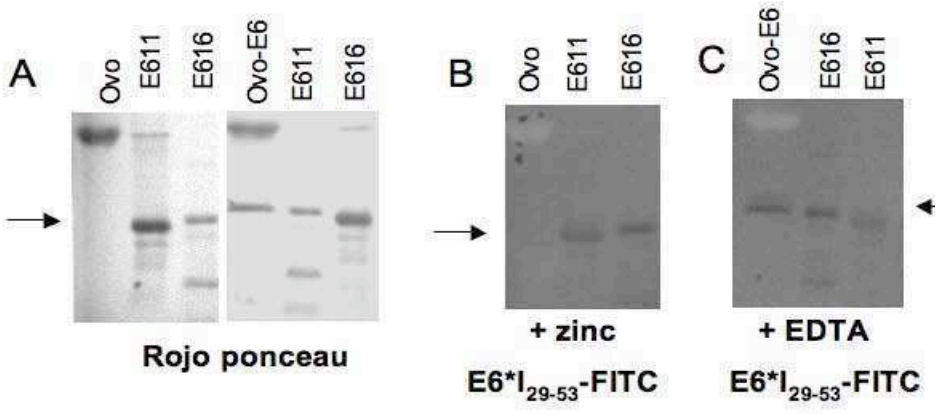


Figura 7. Relevancia del Zn en la interacción directa entre la proteína E6 y el péptido E6*I_{29-53}. Las proteínas E6HPV16, E6HPV11 y ovoalbúmina, utilizada como control negativo, se separaron en un gel

SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con una dilución de E6*I_{29-53}-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*. **(A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(B)** incubación en presencia de EDTA. **(C)** incubación en presencia de Zn.

El resultado obtenido indica que no se requiere el metal para detectar interacción entre ambas moléculas, como también ocurre con E6*I. En este experimento, nuevamente se observó una menor asociación de E6*I_{29-53} con la proteína E6 HPV11 indicando la menor afinidad por las proteínas de otros tipos virales.

En paralelo y haciendo uso de las distintas mutantes de E6*I que obtuvimos como proteínas recombinantes (ver capítulo I), evaluamos si E6*I_{29-53} interactuaba con esta región de aminoácidos de la proteína E6 HPV16 y si se requería alguna de las 3 cisteínas presentes en la porción N-terminal de E6 (Figura 8).

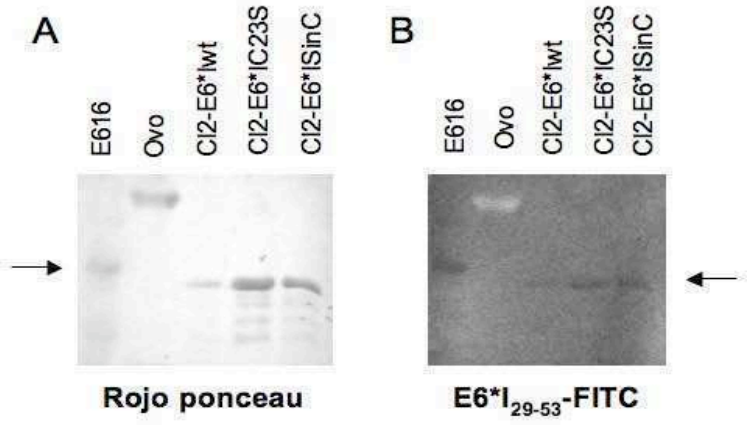


Figura 8. Análisis de la interacción directa entre la proteína E6*I y el péptido E6*I_{29-53}. Las proteínas E6HPV16 con y sin tratamiento con iodoacetamida se separaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **(A)** *Rojo ponceau* de las proteínas transferidas a la membrana. **(B)** Membrana que se incubó con una dilución de E6*I-FITC y posteriormente se reveló en el *storm*.

E6*I_{29-53} se unió a todas las mutantes de la proteína E6*I como lo hace con la proteína E6 (Figura 8B). Este resultado indica que parte de la interacción de E6*I con E6 se da por la porción N-terminal de E6, dando lugar a una *pseudo* homo-oligomerización. Además, la porción de E6*I, E6*I_{29-53}, es fundamental para que ocurra esta asociación.

Los resultados obtenidos indican la relevancia de la porción N-terminal de E6 en la interacción entre ambas moléculas, aunque faltan experimentos utilizando sólo el dominio C-terminal de E6 para comprobar el rol de esta porción de la molécula en la unión caracterizada. Previamente, fue demostrado que el extremo N-terminal de E6 es fundamental en la actividad de degradación de p53 dado que la deleción de los

primeros residuos de E6 (*109*) o la utilización de anticuerpos monoclonales que se unen a esta región, inhiben la degradación de p53 mediada por la proteína E6 (*167*).

Pese a no observarse la necesidad del Zn o las cisteínas como pre-requisito para la interacción, en solución, ambos componentes pueden influir en la afinidad o en la capacidad de discriminación para que ocurra la interacción.

Finalmente, esta constituye la primera evidencia de interacción directa entre las proteínas E6 y E6*I de HPV16, y específicamente de E6*I_{29-53} y E6 HPV16. No es posible, mediante este abordaje experimental, discriminar diferencias cuantitativas en la afinidad de estos dos péptidos por la proteína E6 entera.

IV.2. GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS DE DETECCIÓN.

Con el objetivo de estudiar la interacción intracelular de estas dos moléculas, inicialmente se buscó generar una herramienta a utilizar en ensayos funcionales y que permitiera la detección de las proteínas virales E6 y E6*I en un contexto celular. Como se mencionó previamente, en el laboratorio se detectó la proteína E6 endógena utilizando sueros de ratón (*75*) pero la cantidad de suero policlonal obtenido a partir de ratones limita la cantidad de experimentos a realizar. Por otro lado, dada la dificultad de detección de esta proteína y las inconsistencias observadas en cuanto a su localización (ver Introducción), decidimos producir anticuerpos monoclonales que detecten a la oncoproteína E6. Para esto se utilizó el protocolo de obtención de anticuerpos monoclonales desarrollado por C. Milstein y G. Köhler (*168*).

Es importante mencionar que se ha descripto que esta proteína posee escasa inmunogenicidad; por ejemplo, un grupo reportó que de 1200 clones evaluados, sólo 3 tuvieron alta reactividad contra E6 (*169*). Actualmente son muy pocos los anticuerpos monoclonales anti-HPV E6 reportados en bibliografía y disponibles para su utilización en investigación y clínica, y la mayoría reconocen la porción N-terminal de la proteína. Por ejemplo, la inmunización con GST-E6 HPV16 generó sólo dos anticuerpos monoclonales que reconocen una región del N-terminal de E6, particularmente los residuos 7-17 de E6 HPV16 (*167*). Kanda et al utilizó proteína recombinante desnaturalizada en urea para inmunizar ratones y también aisló un único anticuerpo monoclonal que reconoce la región del N-terminal de E6 (*71*) . Estos resultados sugieren que los aminoácidos contenidos dentro de esta porción de la proteína E6 HPV16 son particularmente inmunogénicos.

El antígeno utilizado fue la proteína E6 de la cepa HPV16 que se purificó como fusión a un *tag* de histidinas, de acuerdo al protocolo publicado previamente por nuestro laboratorio (*75*). Se utilizaron 5 ratones Balb-c y el plan de inmunización que se llevó a cabo fue el siguiente:

Figura 9. Representación esquemática del plan de inmunización realizado con la proteína His-E6HPV16. Se indican los días en que se realizaron las distintas inmunizaciones y las características de cada una.

En la semana 7, luego de aplicar las tres inmunizaciones, se realizó una sangría exploratoria para analizar mediante ensayos de ELISA indirecto la respuesta al inmunógeno y seleccionar el ratón a utilizar en la fusión. Como se observa en la Figura 10, todos los ratones inmunizados tuvieron suero con reactividad alta para las proteínas E6 y E6*I, aunque un poco menor para esta última; la reactividad fue menor para el *tag* de histidinas cuya reactividad fue analizada utilizando la proteína EBNA del virus *Epstein bar* fusionada a este *tag*.

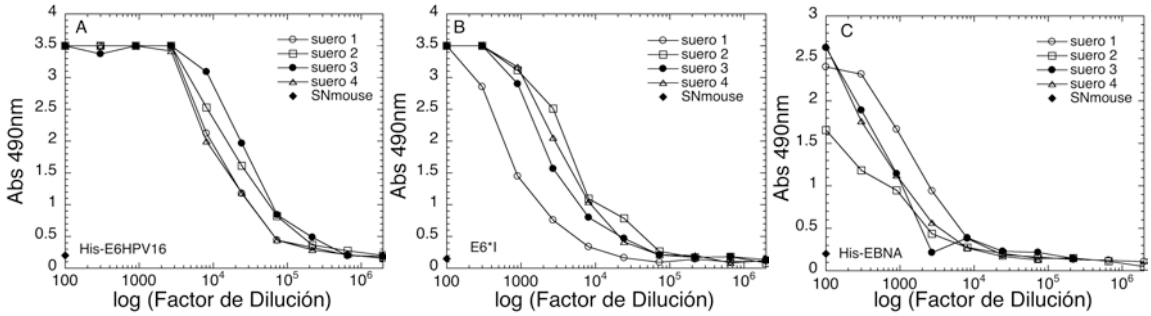


Figura 10. Análisis por ELISA indirecto de la reactividad de los sueros previo a la fusión. Se evaluó la reactividad de los sueros de los distintos ratones inmunizados para elegir el ratón con el que realizar la fusión. Las placas se sensibilizaron con 0.25μg de **(A)** His-E6HPV16; **(B)** E6*I y **(C)** His-EBNA.

El día de la fusión se disgregó el bazo del ratón N°3 para obtener los linfocitos B que se fusionaron, en presencia de PEG (polietilenglicol), con células tumorales de mieloma múltiple (NSO) deficientes en enzimas implicadas en la síntesis de ADN

como la timidina quinasa (TK) o la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Los productos de la fusión celular, denominados hibridomas, fueron cultivados en medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) donde se eliminaron las células de mieloma y sólo los hibridomas fueron capaces de crecer. Después de cultivar aproximadamente durante dos semanas estas células para permitir la producción de cantidad suficiente de anticuerpos y así identificarlos mediante ELISA indirecto, se realizó una selección de los hibridomas que producían anticuerpos que reconocían el antígeno E6 y posteriormente se clonaron a dilución infinita para obtener colonias únicas que producían sólo un tipo de anticuerpo.

Se clonaron 6 hibridomas de los cuáles se obtuvieron 3 clones positivos con alta reactividad para la proteína E6 HPV16 y baja para el *tag* de histidinas (Figura 11).

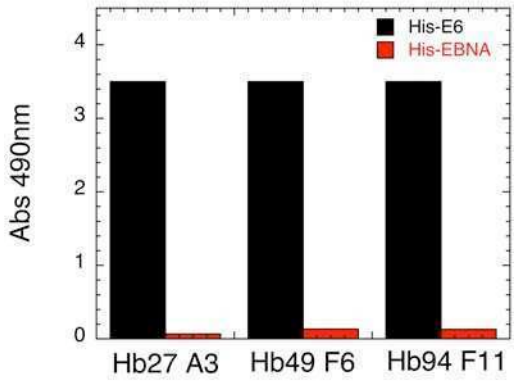


Figura 11. Reactividad de los clones obtenidos contra la proteína E6HPV16. Se evaluó por ELISA indirecto la reactividad diferencial de los clones obtenidos luego de la fusión para descartar aquellos que sólo reconozcan el *tag* de histidinas. Las placas se sensibilizaron con 0.25μg de His-E6HPV16 (barra negra) y de His-EBNA (barra roja).

A partir del sobrenadante de cultivo de células provenientes de los diferentes clones positivos obtenidos, se determinó utilizando un *kit* de isotipado que el anticuerpo monoclonal producido por el clon 94 F11 es una IgG 2b cadena liviana k y el producido por el clon 27 A3 es una IgG 2a cadena liviana k.

IV.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS.

Con el fin de caracterizar los anticuerpos monoclonales obtenidos en la fusión, se inyectaron las células de los diferentes hibridomas en la cavidad peritoneal de

ratones Balb-c para producir líquido ascítico. A partir de esta solución se realizaron todos los experimentos que se describen en esta sección.

IV.3.1. Reactividad analizada por ELISA indirecto.

Inicialmente se determinó por ELISA indirecto la reactividad de los anticuerpos 94 F11 y 27 A3 por las proteínas E6 y E6*I (Figura 12). Para esto, se sensibilizó una placa con sucesivas diluciones de las proteínas E6 y E6*I y mediante un ensayo de ELISA indirecto se determinó el título de ambos anticuerpos por las proteínas analizadas, correspondiendo a la máxima dilución donde se obtiene la mitad de la señal entre la sumatoria del máximo y el mínimo de DO obtenida. En ambos casos la reactividad por E6 y E6*I fue muy alta; el título del anticuerpo monoclonal 94 F11 es de 1/218700 y 1/72900 para E6 y E6*I, respectivamente mientras que para 27 A3 fue de 1/72900 y 1/24300, respectivamente. El título para la proteína E6*I es un poco más bajo que para la proteína E6, aunque la relación de los títulos entre E6 y E6*I de cada anticuerpo es la misma. En lugar de una menor reactividad, esto sugiere un menor pegado de E6*I a la placa.

Cabe destacar que, evaluando las proteínas en su estado nativo, los títulos son muy altos para las dos especies, hecho que puede dificultar la diferenciación de ambas especies en un contexto celular. Este resultado sugiere además que el epitope de reconocimiento de ambos anticuerpos se encuentra en las dos moléculas por lo que debe estar restringido a los primeros 50 aminoácidos de la proteína E6. Los datos se encuentran en línea con los observados en bibliografía donde los escasos anticuerpos monoclonales obtenidos reconocen el extremo N-terminal de la oncoproteína E6.

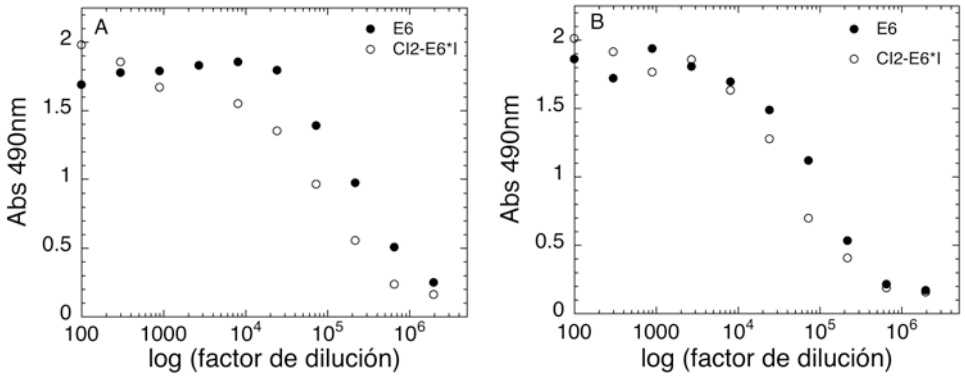


Figura 12. Reactividad de los anticuerpos monoclonales obtenidos contra las proteínas E6 y E6*I HPV16. Se evaluó por titulación en ELISA indirecto la reactividad de los anticuerpos monoclonales **(A)** 94 F11 y **(B)** 27 A3 por las proteínas E6 (círculo negro) y CI2-E6*I (círculo vacío). Los títulos de los

anticuerpos se determinaron como la dilución del líquido ascítico en donde se obtuvo el 50% de la señal entre la sumatoria del máximo y el mínimo de absorbancia obtenida.

*IV.3.2. Reconocimiento de las proteínas E6 y E6*I en western blot.*

Posteriormente se evaluó la capacidad de reconocer a E6 y E6*I en geles desnaturalizantes SDS-PAGE mediante la técnica de *Western Blot*; ambos anticuerpos las reconocen en su estado desnaturalizado (Figura 14) indicando que el epitope de reconocimiento es lineal. Además, nuevamente el hecho de reconocer tanto a E6 como a E6*I confirma que los anticuerpos reconocen a una porción N-terminal de la secuencia de E6 y parte del epítope está contenido en la secuencia de E6*I.

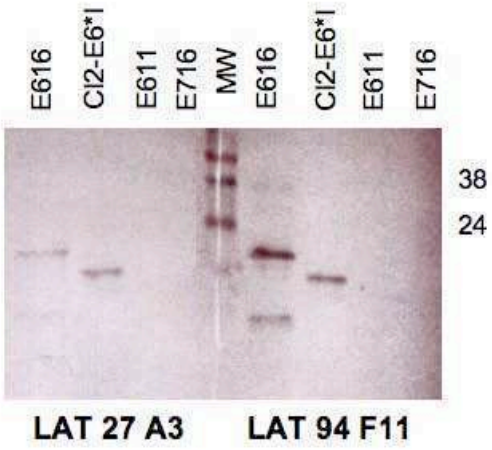


Figura 13. Western blot de las proteínas E6 y E6*I utilizando los anticuerpos monoclonales obtenidos. Izquierda: E6HPV16, Cl2-E6*I HPV16 y E6 HPV11 y E7 HPV16 utilizadas como controles negativos. Se incubó con una dilución 1/1000 del líquido ascítico (LAT) del mab 27 A3. **Derecha**: E6HPV16, Cl2-E6*I HPV16 y E6 HPV11 y E7 HPV16 utilizadas como controles negativos. Se incubó con una dilución 1/1000 del líquido ascítico (LAT) del mab 94 F11. Se utilizó 0.2μg de cada proteína y se reveló con el reactivo α-cloro naftol.

Asimismo, se analizó la especificidad de los anticuerpos por el tipo viral HPV16 al comparar la reactividad por *western blot* con la proteína E6 de HPV11 (Figura 13). Ambos anticuerpos no reaccionaron contra la proteína E6 del tipo viral de bajo riesgo HPV11, indicando que son altamente específicos para E6 HPV16.

IV.4. DISCUSIÓN.

En este capítulo final se intenta aportar conocimiento respecto del mecanismo mediante el cual E6*I ejerce su efecto en la célula. El principal efecto mencionado en la literatura es la regulación fina de la actividad de E6 a través, principalmente, de la inhibición de la degradación de p53 mediada por esta proteína. En este sentido, se

evaluó la existencia de interacción directa entre estas dos proteínas de HPV16, ya demostrada para E6*I de HPV18 (*97*). Se utilizaron los conocimientos respecto a las propiedades conformacionales de E6*I HPV16 adquiridos a lo largo de este trabajo, en conjunto con la información bibliográfica, para plantear un modelo de acción probable para este péptido.

Se confirmó la existencia de interacción directa entre las proteínas E6*I y E6 de HPV16 producidas en nuestro laboratorio. También se observó que la porción C-terminal de E6*I ($E6*I_{29-53}$) es suficiente para obtener asociación entre las moléculas. Además, la interacción ocurriría a través de los primeros 50 residuos de E6 (coincidente con la secuencia de E6*I) y no se requieren el metal o las cisteínas para que tenga lugar esta unión. Por último, la reacción es altamente específica, reconociendo a la proteína E6 HPV16 en una mezcla compleja de proteínas y observándose además, una aparente diferencia de afinidades con proteínas E6 de otros tipos virales.

No obstante, sabemos que se requieren más experimentos para caracterizar el sistema completamente, y en particular desarrollar un modelo experimental en solución que permita analizar afinidades diferenciales entre las distintas moléculas evaluadas. Cabe mencionar que todas las proteínas del sistema son particularmente difíciles de trabajar, lo que incrementa la complejidad de los experimentos limitando las técnicas a aplicar.

Independientemente de lo expuesto previamente, la interacción entre ambas proteínas es determinante para que E6*I ejerza su función en la célula, y nosotros demostramos la existencia de esta interacción *in vitro*, sentando las bases del mecanismo de acción.

Hay múltiples ejemplos en literatura que muestran las distintas formas en que ésta asociación E6*I/E6 pueda llevar a la inhibición de la actividad de la proteína E6 entera. Por un lado, E6*I podría actuar como los anticuerpos monoclonales anti-E6 obtenidos por Giovane et al, los cuales bloquean específicamente la degradación *in vitro* de p53 mediada por E6. Estos anticuerpos reconocen la región N-terminal de E6 HPV16, en particular los residuos 7 a 17, sugiriendo que el extremo N-terminal de esta oncoproteína es fundamental en los mecanismos que llevan a la degradación de p53 (*167*). En particular, se demostró que la ausencia por deleción de los residuos 14-17 interrumpe drásticamente la degradación de p53; esto puede ocurrir por interrumpir el plegamiento de la proteína, perdiendo por consiguiente la funcionalidad. También

demostraron, utilizando los anticuerpos monoclonales, la importancia de esta porción de E6 HPV16 tanto en la degradación de p53 como en la unión al *core domain* de p53 dependiente de E6AP, concluyendo que es necesario un extremo N-terminal accesible para la formación de complejos activos E6/E6AP/p53 (*169*). A través de la unión observada al extremo N-terminal de la oncoproteína E6, E6*I puede inhibir la formación del complejo ternario y por consiguiente parte de las funciones de E6.

Por otro lado, E6*I puede actuar como la mutante E6 47F que presenta un fuerte efecto dominante negativo sobre la actividad de degradación de p53 de E6 HPV18 endógena (*80*). Esta mutante es incapaz de reclutar la proteína p53 y su inhibición podría estar asociada a la captación de toda la reserva de E6AP por parte de E6 47F o a través de la unión directa con E6 HPV18 salvaje. Este último mecanismo fue propuesto por Pim et al para explicar la inhibición de la degradación de p53 dependiente de E6, observada en presencia del producto de procesamiento alternativo E6*I HPV18. Este grupo concluye que la unión de E6*I a la proteína entera E6 HPV18 es fundamental para las propiedades antiproliferativas de la proteína E6*I. Además, mediante la construcción de diferentes mutantes, postuló como esenciales los residuos 30-33 de E6*I HPV18 para inhibir la función de E6 sobre p53. Estos residuos son contiguos al motivo CxxC en E6*I y la deleción anula la interacción con E6, disminuyendo drásticamente la habilidad de inhibir la degradación *in vitro* de p53 dirigida por E6 y con ello la capacidad de bloquear la proliferación de células HPV-positivas (*97*).

Nuestros resultados muestran por primera vez la asociación directa entre las proteínas E6 y E6*I del tipo viral HPV16, donde ésta unión es determinante para la inhibición de la degradación de p53 mediada por E6. Además, en concordancia con los resultados obtenidos para E6*I HPV18, confirmamos el requerimiento de los primeros residuos de E6 y de los residuos de la porción C-terminal de E6*I para que ocurra la interacción. Previamente en el laboratorio se demostró que la especie oligomérica de E6 (E6SOs) no degradaba p53 mientras el monómero sí lo hacía (*75*). Esto indica que tanto la homo-oligomerización como la hetero-oligomerización con E6*I o con una mutante inactiva de E6 como E6 F47R, que actúen como proteínas con efecto dominante negativo, inhiben la degradación de p53. En el Capítulo I mostramos la alta tendencia de E6*I a oligomerizar y esto puede ocurrir con ella misma, con E6, como se demostró en este capítulo, e incluir otras proteínas celulares, logrando de este modo ejercer su efecto pleiotrópico además del específico vinculado a p53.

Por último, se obtuvieron anticuerpos monoclonales altamente específicos y de alto título contra la proteína E6 de HPV16. En experimentos de ELISA y *western blot* se observó que estos anticuerpos también reconocen a E6*I, indicando que el epitope de reconocimiento se encuentra en el extremo N-terminal de E6. Como se mencionó previamente, esto coincide con los anticuerpos monoclonales descriptos en bibliografía, donde la mayoría reconocen un fragmento del extremo N-terminal de E6 indicando que es la zona de mayor inmunogenicidad de esta proteína poco antigénica.

Los datos presentados en este capítulo contribuyen a profundizar en los mecanismos moleculares de la interacción. El desarrollo de nuevos experimentos junto con la utilización de las herramientas generadas, permitirá dilucidar el mecanismo de acción de este pequeño pero complejo polipéptido.

DISCUSIÓN GENERAL

Los virus han evolucionado a una organización genética compleja para el uso óptimo de sus genomas limitados y la producción de todas las proteínas estructurales y reguladoras necesarias. Esta organización compleja incluye procesamiento alternativo, superposición de marcos de lectura, mecanismos de regulación de la transcripción y traducción de genomas virales, entre otros. La utilización del procesamiento alternativo es importante para la expresión equilibrada de múltiples reguladores virales a partir de un ARN policistrónico. Además, permite la generación no sólo de proteomas ampliados, sino también de redes de interacción de proteínas más complejas y más finamente moduladas.

El HPV es un virus a ADN doble cadena muy pequeño, con 8 marcos de lectura abiertos (ORF). La expresión génica y la replicación de este virus proceden de una manera muy controlada y finamente regulada por la diferenciación de los queratinocitos (*24*). Durante los últimos diez años, se han realizado progresos notables en la comprensión de cómo esta compleja expresión génica viral está regulada a nivel de la transcripción (por ejemplo, a través de la metilación del ADN) y sobre todo post-transcripcionalmente (incluyendo procesamiento de ARN, poliadenilación, y traducción). Una característica significativa de todos los transcriptos de papilomavirus es que se transcriben como mensajeros bicistrónicos o policistrónicos. Esto da lugar a múltiples productos de procesamiento alternativo y quimeras, en muchos casos con funciones desconocidas, y sin saber en la actualidad fehacientemente qué proteínas se producen (*24*). Por el contrario, el mensajero más abundante en tumores cervicales y líneas celulares naturalmente transformadas por HPV es el transcripto E6*I (*91, 92*), y estaría presente sólo en tipos de alto riesgo, no en los de bajo riesgo como HPV6 y 11 debido a la ausencia del sitio consenso necesario para que ocurra la edición del ARN (*91, 92*). El procesamiento alternativo en este mensajero interrumpe el marco de lectura abierto de la oncoproteína E6 sin modificar el marco de E7, por lo que la proteína E6 deja de expresarese.

Un interrogante importante a responder es cuál es la relevancia de este producto obtenido por procesamiento alternativo, dado que se encuentra altamente representado en líneas celulares transformadas por HPV. Actualmente existen dos líneas fundamentales que intentan dilucidar este interrogante. Por un lado, postulan que E6*I tiene relevancia a nivel transcripcional; consideran que este procesamiento del ARN incrementa la eficiencia de traducción de E7, al aumentar el espacio inter-cistrónico entre ambos ORF y permitiendo a toda la maquinaria de traducción ubicarse con mayor facilidad (*95*). Por otro lado, diferentes grupos atribuyen efectos como proteína a este

producto generado por procesamiento alternativo. La actividad más caracterizada hasta el momento está asociada a la regulación negativa de la proteína E6 entera de la que deriva, principalmente a través de inhibir la degradación de p53 mediada por E6. En nuestro caso, abordamos esta última posibilidad a través de la caracterización bioquímica y conformacional de E6*I (*98*).

El procesamiento del ARN genera la aparición de un codón de terminación prematuro que, por un lado, evita la expresión de la proteína E6 entera y por el otro, da lugar a la traducción de un péptido de 50 residuos que corresponden exactamente a los primeros 50 aminoácidos presentes en la proteína E6 HPV16. De este modo, E6*I sólo contiene la mitad de la información para constituir un dominio independiente de plegamiento de tipo *Zn finger* como el observado para E6. La ausencia de la mitad del motivo de unión a Zn presente en el dominio N-terminal de E6, que además está estrictamente conservado en todas las proteínas E6 de PVs, indica que la estructura de E6*I debe ser distinta de la adoptada por la proteína E6 entera.

En esta tesis mostramos por primera vez que E6*I adopta diferentes conformaciones en solución y observamos una fuerte tendencia de este péptido a oligomerizar. A pH 5.0 obtuvimos oligómeros con estructura secundaria tipo lámina-β y que unen la sonda fluorescente ThT. Imágenes obtenidas por AFM presentan estructuras tipo-gusanos similares a las observadas en estructuras amiloideas; si bien actualmente se sabe que cualquier proteína puede, en las condiciones indicadas, adoptar este tipo de conformaciones (*115*), las estructuras con características amiloides se ven sobre-representadas en HPV. Se demostró la existencia de estas estructuras *in vivo* tanto para la oncoproteína E7 (*49*) como para la proteína E1^E4. Interesantemente, E1^E4 también se obtiene por procesamiento alternativo, y las fibras amiloides son especies funcionales de esta proteína (*116*). Además se observó que el regulador transcripcional E2 puede adoptar *in vitro* conformaciones similares a las observadas en rutas amiloides (*117*). Por último, la observación de la formación espontánea de estos oligómeros también en E6*I, da relevancia a este proceso en el funcionamiento natural del virus.

Por otro lado, E6*I a pH 7.5 forma oligómeros con estructura tipo hélice-α. Estas estructuras no se observan tan frecuentemente en péptidos y proteínas como los oligómeros-β; curiosamente, estas estructuras a pH 7.5 tienen similitud con los oligómeros E6SOs caracterizados previamente en el laboratorio para la proteína E6 entera (*75*). Las estructuras de alto peso molecular obtenidas con E6*I a este pH son marginalmente estables y su existencia en la célula puede estar relacionada con un reservorio de

proteína en equilibrio con múltiples conformaciones que incrementen o modifiquen los efectos de este polipéptido. A su vez, dependiendo de las condiciones del micro-entorno, E6*I podría formar los oligómeros-β con características amiloides.

La oligomerización fue demostrada para las proteínas E6 de distintos tipos virales tanto *in vitro* como *in vivo* (*75, 84*) y algunos grupos indican al N-terminal como un dominio inestable y responsable de la agregación de la proteína E6 entera. Nosotros confirmamos esta hipótesis e indicamos a E6*I como la secuencia que dirige la oligomerización de la proteína E6 entera.

La presencia de Zn impide la formación de los oligómeros con estructura tipo hélice-α, dando lugar a un péptido de tamaño pequeño y definido cuyo espectro de DC no posee características de estructura secundaria canónica. La modulación de las conformaciones de E6*I observada en presencia del metal indica que E6*I une Zn, este resultado es sorprendente considerando que E6*I solo posee la mitad de un motivo de unión a Zn. Observamos que E6*I forma un centro de coordinación de Zn de alta afinidad y están involucradas las cisteínas del motivo CxxC; de hecho, en ausencia de metal éstas cisteínas se oxidan para formar un puente disulfuro intra-molecular. La unión a metal ocurre a través de la formación de un dímero, regenerando la geometría de coordinación de la proteína entera, y la alta afinidad aparente observada (K_D de alrededor de 10^{-14} M) se encuentra en el orden de proteínas documentadas que unen Zn en un contexto biológico (*158*). Dadas las concentraciones extremadamente bajas de Zn libre dentro de una célula (*159*), este dato es de extrema importancia para sugerir que el fenómeno aquí descripto puede ocurrir en la célula. En un contexto intracelular, el equilibrio entre especies oligoméricas y aquellas de bajo peso molecular estará determinado por la disponibilidad de Zn.

Posteriormente, acotamos el estudio de las propiedades conformacionales de E6*I a la porción C-terminal de este péptido, que denominamos E6*I_{29-53}. Los experimentos muestran que el péptido tiene una alta tendencia a formar estructura tipo hélice-α y que el metal interrumpe parte de esta hélice. Este resultado es coherente con la presencia en la secuencia de E6*I_{29-53} de los residuos CxxC correspondientes a la mitad del motivo de unión a Zn. E6*I_{29-53} también une Zn pero con menor afinidad que en el contexto del péptido entero. Esto indica la presencia de un componente conformacional en la unión al metal, que regula la afinidad más allá de su secuencia lineal, y una mayor complejidad en la estructura de esta especie de E6*I que se encuentra mediada por los primeros 25 residuos de la molécula.

El Zn puede constituir un mecanismo de regulación importante del efecto de E6*I en el contexto celular. El estado de oligomerización y las propiedades conformacionales de E6*I se modifican radicalmente en presencia de Zn, resultando en la obtención de una molécula pequeña y "extendida". El metal tiende a mantener el péptido en esta estructura extendida capaz de favorecer la interacción con múltiples blancos celulares y, de este modo, ejercer su efecto. Además, la interacción con otros blancos puede favorecer el plegamiento del péptido y la permanencia dentro de la célula. Por otro lado, la oxidación y la unión a metal ocurren en los mismos residuos y pueden actuar como un mecanismo de encendido y apagado que regule el efecto biológico de E6*I. Existen actualmente en la bibliografía múltiples ejemplos donde este mecanismo de regulación tiene lugar; un ejemplo de ésto es la chaperona bacteriana Hsp33, donde la pérdida del Zn fuertemente unido genera la oxidación de sus cisteínas con un concomitante cambio estructural que activa a la proteína (*152*).

Todos los resultados expuestos en esta tesis constituyen la primera evidencia respecto de las propiedades bioquímicas y conformacionales de E6*I, donde observamos un comportamiento complejo y modular de este pequeño polipéptido.

E6*I es capaz de responder tanto a cambios en el pH intracelular como a variaciones de disponibilidad de Zn y traducirlo en cambios conformacionales que, por ejemplo, modifiquen el espectro de blancos que une. Esto también se observó para la proteína E7 de HPV. En este caso, E7 es una proteína dimérica que une una molécula de Zn por monómero; *in vitro*, el agente que dispara la oligomerización de E7 es el reactivo EDTA que extrae el Zn de la región CR3 (*42, 47*). Este dominio sólo está conservado entre las proteínas E7 y E6 de HPV y no se ha encontrado homología de secuencia con otras proteínas; la formación de este tipo de oligómeros sería una propiedad compartida por estas proteínas.

Finalmente, demostramos por primera vez la interacción directa de las proteínas E6 y E6*I del tipo viral HPV16. Esta interacción es altamente específica, reconociendo a la proteína E6 HPV16 en una mezcla compleja de proteínas y observándose además, una aparente diferencia de afinidades con proteínas E6 de otros tipos virales. Esta interacción se puede mapear a la región C-terminal de E6*I, responsable de muchas de las propiedades del péptido. La homo-oligomerización de ambas especies fue demostrada por nuestro laboratorio (*75, 130*), y los experimentos de interacción muestran que también puede existir la hetero-oligomerización entre las proteínas E6 y E6*I. Esta hetero-oligomerización es la que le permite a E6*I inhibir las funciones de la proteína E6 entera.

En literatura se encuentran múltiples ejemplos donde los productos proteicos obtenidos por procesamiento alternativo se unen a las proteínas de las que derivan e inhiben sus funciones, actuando como "mutantes" dominante negativas. El supresor tumoral p53 es uno de estos ejemplos: la variante Δp53 obtenida por procesamiento alternativo se une a p53 entera, formando tetrámeros mixtos inactivos (*170*).

Por otro lado, la alta especificidad observada en la interacción E6-E6*I sugiere que esta secuencia, en el contexto de la proteína E6 entera, sería responsable principalmente de la homo-oligomerización mientras que otras regiones de E6, como el C-terminal, que contiene el motivo de unión a proteínas PDZ, estarían involucradas en la interacción con blancos celulares o virales.

Las oncoproteínas E6 y E7 también se encuentran en equilibrio con especies oligoméricas que presentan características conformacionales diferentes y propias. Ambos oligómeros fueron detectados *in vivo* por nuestro laboratorio. La formación de estas supra-estructuras permitiría un mayor número de interacciones, y no queda descartado que puedan formar hetero-oligómeros con sus blancos. De todos los blancos celulares descriptos para ambas, aquellos más importantes serán los que cumplan roles regulatorios en el control del ciclo celular, polaridad celular o estabilidad de los cromosomas (*26*). Este equilibrio resulta complejo y se verá afectado por condiciones de estrés celular y por el estado de diferenciación celular. En este contexto, E6*I se suma para aportar complejidad al sistema. De hecho, el péptido podría formar parte de esos hetero-oligómeros modulando la función de la proteína E6, y posiblemente, de la proteína E7.

E6*I actuaría como un punto de regulación fino de la proteína E6 entera de la que deriva. Claramente, la relevancia de este péptido se da durante el ciclo de vida normal del virus. En esos momentos, la expresión de E7 en los niveles basales desregula el ciclo celular dando lugar a un incremento en la duplicación que finalmente induce la muerte celular programada o apoptosis; es en este momento donde se produce E6, que inhibe la apoptosis celular. Una acción desregulada de esta oncoproteína lleva a la transformación celular que, a largo plazo genera la pérdida de algunos genes virales y por consiguiente su capacidad replicativa. En este sentido, la expresión de E6*I controla la actividad de E6; por un lado, el procesamiento alternativo que da lugar a E6*I interrumpe el ORF de E6 evitando la expresión de la proteína E6 y por el otro lado la proteína E6*I inhibe actividades de E6 que pueden llevar a la transformación celular evitando que ocurra este proceso. En esta línea, es tentador especular que la interacción virus-célula es capaz de

"sensar" el número de copias virales y regular el exceso de actividad de los genes con el fin de garantizar la viabilidad de las células. La desregulación posterior de la expresión de las proteínas E6 y E7 debido a la pérdida de E2, como ocurre en los procesos cancerosos, provoca que los otros elementos de regulación fina virales, como es el caso de E6*I, no puedan evitar la transformación celular.

En conjunto, los estudios presentados en este trabajo representan el primer aporte al conocimiento de los mecanismos básicos de plegamiento y de las propiedades en solución de E6*I, polipéptido al que se le atribuyen múltiples efectos en el contexto celular pero del que se desconocen aspectos fundamentales bioquímicos y estructurales. Pese a interrumpir un motivo independiente de plegamiento, mostramos por primera vez que este péptido compuesto por 50 residuos es capaz de adoptar conformaciones estructuralmente no relacionadas entre ellas que incluyen estados con baja cantidad de estructura secundaria canónica y estabilidad marginal, conformaciones amiloidogénicas y diferentes especies oligoméricas, unas con contenido de hélice-α y otras con lámina-β (*130*)). Además, demostramos que ,pese a tener sólo la mitad de un motivo de unión a Zn, E6*I reconstituye un dominio de unión a Zn a través de la formación de un centro de coordinación de alta afinidad constituido por dos moléculas de péptido, donde las cisteínas 37 y 40 serían los ligandos de la esfera primaria de coordinación del metal. En este contexto, es posible considerar a E6*I como una secuencia camaleón.

Finalmente, en un contexto celular los niveles de proteína, disponibilidad de Zn, estado de oxidación y pH determinarán el destino de E6*I, que se encuentra fuertemente vinculado a la regulación de la proteína E6.

PUBLICACIONES.

Parte del trabajo desarrollado durante la presente tesis doctoral está contenido en la suguiente publicación:

E6*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the E6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder". **Heer A,** Alonso LG and de Prat Gay G. Biochemistry (2011) 50 (8), 1376-1383.

MATERIALES Y MÉTODOS

Alineamiento de secuencias y análisis bioinformático.

Construcción de logos de secuencia: los logos de secuencia fueron construidos con el programa WebLogo (*171*) (http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) y utilizando un alineamiento manual de 66 secuencias de la porción N-terminal de todas las proteínas E6 del género alfa y con tropismo genital. Las secuencias de las proteínas E6 fueron obtenidas de la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). La altura total de las letras en cada posición i es calculada como:

$$R_{secuencia}(i) = \log_2(s) + \Sigma f(a,i)\log_2(f(b,i)) - \frac{s-1}{2\ \ln(2)\ n} \qquad (1)$$

donde s es el número de símbolos (20 para proteínas) y f (a,i) son las fracciones de cada aminoácido en la posición i. El tercer término es una corrección por el tamaño de la muestra, donde n es el número de secuencias en el alineamiento. El valor máximo de Rsecuencia es 4.32 para proteínas, y el mínimo es cero. La altura de cada símbolo dentro de una posición es proporcional a su abundancia:

$$\text{Altura}(b,i) = f(a,i)\quad R_{secuencia}(i) \qquad (2)$$

Predictores de estructura secundaria: se utilizaron los predictores de estructura secundaria MeDor (*132*) (http:// http://www.vazymolo.org/MeDor/index.html) y AGADIR (*133*) (http://agadir.crg.es). En este último, los diferentes péptidos se evaluaron a pH 7.5, 0.2M fuerza iónica y 298ºK.

Materiales y preparación de la muestra.

El péptido de E6*I se obtuvo por síntesis en fase sólida (Keck facility, Universidad de Yale, New Haven, CT). El péptido crudo, como se recibe de la síntesis, es una mezcla de especies oxidadas y reducidas. Para obtener una solución homogénea completamente reducida, se disolvió péptido liofilizado en una solución conteniendo 6.0M Gdm.Cl (Invitrogen), 50.0mM DTT (Sigma Aldrich), 5.0mM EDTA y se incubó 24hs a 25ºC. El péptido reducido fue purificado por cromatografía de alta presión de fase reversa (RP-HPLC) en una columna C18 (Thermo Scientific), liofilizado y redisuelto en 6.0M Gdm.Cl, 8.0mM HCl para evitar la oxidación de cisteínas.

En general, esta solución madre contiene 0.5mM de E6*I reducido. El peso molecular (MW) fue confirmado por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Microflex, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

La concentración de péptido de cada solución madre se determinó espetrofotométricamente utilizando la absorbancia de tirosinas en una solución de NaOH 0.1M a 293 nm y un coeficiente de extinción molar de 2400M^{-1} cm^{-1} por tirosina.

El protocolo de preparación de la muestra detallado previamente también fue el utilizado para los péptidos E6*I_{29-53}, E6*Ic11, E6*Ic18 y E6*Ic31, correspondientes a los extremos C-terminal de las proteínas E6*I de los tipos virales HPV16, HPV11, HPV18 y HPV31, respectivamente.

Dicroísmo Circular (DC).

Las mediciones de DC fueron realizadas en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco, Japón) empleando una velocidad de escaneo de 100nm/min, un ancho de banda de 1nm, y una respuesta promedio de 4 segundos. La temperatura se mantiene en un rango de ± 0.1ºC, utilizando un dispositivo *peltier*. Los espectros resultantes provienen de un promedio de 8 mediciones. Se utilizaron cubetas de paso óptico de 0.1 o 0.2cm. Los datos crudos son transformados en elipticidad molar por residuo ($[\Theta]_{MWR}$) cuyas unidades son deg.$dmol^{-1}$.cm^2, que normaliza por paso de luz, concentración, y número de enlaces peptídicos:

$$[\Theta]_{MWR} = deg/\ l \times C \times 10 \times N \quad (3)$$

donde:

l = paso de luz en cm

C = concentración expresada en molar

N = número de enlaces peptídicos y corresponde al número total de aminoácidos menos 1 (aa-1)

10 = factor que transforma en dmol

El péptido en 6.0M Gdm.Cl se replegó tanto por dilución como por diálisis en las distintas condiciones evaluadas. A diferencia de este último, por dilución queda Gdm.Cl residual que afecta la medición de DC imposibilitando medir a longitudes de onda bajas. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 13.000 rpm previo a realizar las mediciones.

La especie de E6*I a pH 7.5 en ausencia de Gdm.Cl se obtuvo resuspendiendo péptido liofilizado en el solvente orgánico acetonitrilo, y a partir de esta solución madre concentrada se diluyó en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en presencia del reductor TCEP. Se realizó este protocolo porque las diálisis a pH 7.5 provocaban la precipitación total de la muestra, probablemente por oxidaciones intermoleculares.

En el caso de las especies de E6*I con Zn, el replegado se realizó sobre un *buffer* conteniendo 1.5 equivalentes del metal.

Para evaluar el efecto del NaCl sobre la estructura secundaria de E6*I, se titularon 10.0μM de péptido en *buffer* acetato de sodio pH 5.0 con concentraciones crecientes de NaCl en un rango de 0 a 900mM de la sal. Se incubó 2 minutos entre cada punto y se midió el correspondiente espectro de DC.

Para las termodesnaturalizaciones, a aproximadamente 20.0μM de péptido se le aplicó un gradiente de temperatura de 20℃ a 85℃ a una velocidad de barrido de 5℃/min. Se tomaron espectros al inicio de la termodesnaturalización, a la máxima temperatura alcanzada y finalmente luego de bajar la temperatura a 20℃.

Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

Se evaluó el diámetro hidrodinámico de la especie de E6*I obtenida en *buffer* acetato de sodio pH 5.0 utilizando un aparato de dispersión de luz dinámico, Zetasizer Nano Series Zen 1600 de Malvern Instruments Ltd.(Malvern, Worcestershire, UK). Se utilizó una celda de cuarzo de 1cm de paso de luz y una concentración de péptido de aproximadamente 20.0μM (0.12mg/ml). La temperatura se mantuvo constante a 25ºC utilizando un dispositivo *peltier*. Previo a la medición, se centrifugó la muestra a 13.000 rpm. Los resultados fueron procesados utilizando el programa DTS incluido en el equipo.

Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).

Las mediciones de AFM se realizaron en el Centro de Microscopias Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales coordinado por la Dra. Lía Pietrasanta.

Para adquirir las imágenes de AFM, se diluyó E6*I a aproximadamente 0.2μM (0.0012mg/ml) en 10mM *buffer* acetato de sodio pH 5.0, 1.0mM TCEP. Se depositaron 20 microlitros de la muestra en la mica. 2-5 minutos después se lavó la muestra con agua Mili-Q para remover las moléculas que no se adhirieron firmemente a la mica y se secó con nitrógeno.

Se utilizó un microscopio de Fuerza atómica Nanoscope III Multimode (Digital Instruments, Veeco Metrology, Santa Barbara, CA) y *cantilivers* de 125μm de largo con una fuerza constante de 40N/m (NanoDevices, Veeco Metrology).

Se capturaron imágenes (512 pixeles) con un tamaño de la imágen entre 0.5 y 3.0μm y una velocidad de escaneo de 1-2 líneas/segundo. Las imágenes se procesaron utilizando el programa Nanoscope (Digital Instruments), el cual permitió remover el ruido

de base. Posteriormente, se utilizó el programa WsxM 4.0 Beta 2.1 para analizar las imágenes.

Fluorescencia de Tioflavina T (ThT).

Las mediciones fueron realizadas a una concentración final de 10.0μM de proteína en 20mM *buffer* fosfato de sodio pH 7.0 y 20.0μM de Tioflavina T. El espectro de emisión se obtuvo en un espectrofluorímetro Aminco-Bowman a longitudes de onda de excitación y emisión de 435 y 490 nm, respectivamente. Como control positivo se utilizaron los oligómeros de E7SOs (*47*).

Dado que el pH bajo modifica las propiedades de fluorescencia de la Tioflavina T, previo a la medición E6*I a pH 5.0 se dializó durante 2 horas en 20mM *buffer* fosfato de sodio pH 7.0.

Filtración en columnas de exclusión molecular (SEC).

En los experimentos de SEC analíticas se utilizaron una columna Superdex 75 (Amersham Pharmacia) cuyo rango de inclusión comprende proteínas globulares entre 3.000 y 70.000 Da y una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) con un rango de 10.000 a 600.000 Da, equilibradas en 50mM Tris-HCl *buffer* pH 7.5 y 0.2M Gdm.Cl y 50mM Tris-HCl *buffer* pH 8.8, respectivamente. Se calibraron utilizando proteínas globulares como marcadores estándares de peso molecular; para la columna Superdex 200 se utilizaron: BSA (67kDa), ovoalbúmina (43kDa), Quimiotripsinógeno A (25kDa) y Ribonucleasa A (16.4kDa) obtenidos de Amersham Pharmacia y para la Superdex 75: gamma globulina (158KDa), ovoalbumina (43KDa), mioglobina (17kDa) y vitamina B12 (1.35KDa), *kit* de calibración obtenido de Biorad. La elución de los péptidos se detectó a 220 nm.

El volumen muerto (V0) y el volumen total (V0 + Vi) fueron determinados inyectando el polímero azul dextrano y acetona, respectivamente. Todas las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm antes de ser introducidas en las columnas.

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida.

Todos los SDS-PAGE fueron realizados según el método de Laemmli (*172*). Para E6*I_{29-53} se corrieron geles Tris-Tricina. Previo a la siembra de las muestras en el gel, éstas son tratadas con el *buffer* 125mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.02% azul de Bromofenol, 25% v/v glicerol, 0.2M DTT (*buffer* de siembra). Los geles son teñidos con una solución de *Coomassie Blue*. Previo a sembrar muestras que contienen Gdm.Cl,

estas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se resuspendieron en *buffer* de siembra.

*Clonado, expresión y purificación de E6*I y sus mutantes como proteínas de fusión.*

Clonado: E6*I de HPV16 se amplificó a partir del plásmido pet15b-E6HPV16 ampliamente utlizado en nuestro laboratorio y se clonó en el plásmido pGEM-T (Promega) con los siguientes cebadores:

Fw 5'-GGAATTCCATATGCACCAAAAGAGAACT-3'.

Back 5'-CGGGATCCTTACAGCTGGGTTTC-3'.

Esta construcción se utilizó para realizar las distintas mutaciones mencionadas en la tesis; las mutaciones fueron conservativas cambiando cisteínas por serinas y los cebadores utilizados fueron los siguientes: VER NOMENCLATURA

C23S Fw 5'-GGAATTCCATATGCACCAAAAGAGAACT-3'.
Back 5'-CGGGATCCTTACAGCTGGGTTTC-3'.

C37S y C40S (CxxC) Fw 5'-GGAATTCCATATGCACCAAAAGAGAACT-3'.
Back 5'-CGGGATCCTTACAGCTGGGTTTC-3'.

C23S, C37S y C40S (SinC) Sobre la mutante con las cisteínas 37 y 40 mutadas se utilizaron los cebadores de la mutación C23S para eliminar todas las cisteínas de la secuencia de E6*I.

Posteriormente se subclonaron en diferentes plásmidos de expresión; el producto de ligación fue transformado en la cepa de *E. coli* DH5α y seleccionado con ampicilina (100μg/ml); las colonias transformantes positivas fueron identificadas por *colony*-PCR utilizando el mismo par de cebadores y finalmente chequeadas por secuenciación. Los plásmidos resultantes fueron purificados y utilizados para la expresión de la proteína en bacterias. El vector pet15b contiene en el extremo N-terminal un *tag* de Histidinas (6x) y una secuencia de corte para la proteasa trombina (secuencia: LVPRGS) expresando las construcciones ligadas a un *tag* de histidinas que permite su purificación por columnas de afinidad de níquel. El vector pMalC posee en el extremo N-terminal la proteína MBP (*Maltose Binding Protein*) y una secuencia de corte para la proteasa trombina. Por último, se utilizó el vector pGPG, plásmido modificado en nuestro laboratorio, con el que se obtiene una proteína de fusión con la proteína CI2 (*chimotripsin inhibitor 2*) en el extremo N-terminal y un péptido señal que permite la traslocación al periplasma bacteriano facilitando ampliamente la purificación de la proteína de interés. A diferencia de los dos vectores mencionados anteriormente, el vector pGPG no se induce por IPTG. Posee un

promotor que se reprime por altas concentraciones de fosfato siendo necesario expresar estas construcciones en medio mínimo.

Expresión: Se realizaron pruebas de expresión con las tres construcciones, obteniendo clones con alta expresión de E6*I sólo con el vector pGPG. Las pruebas de expresión fueron realizadas en la cepa de bacterias *E.coli* Bl21(DE3)pLysS, y utilizando los siguientes medios de cultivo: mínimo (M95X), Luria Beltrani (LB) y Medio 2TY. Brevemente, 2.0ml de medio de cultivo con las bacterias transformadas con los diferentes vectores se crecieron a 37℃ hasta alcanzar una densidad óptica (DO) aproximada de 0.6, momento en el cual se indujeron con IPTG o bajas concentraciones de fosfato. Las bacterias se cosecharon 12hs después de la inducción, se tomaron alícuotas correspondientes a la misma cantidad de bacterias para todas las condiciones y se analizó el nivel de expresión en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 15% (SDS-PAGE).

Posteriormente se evaluó la localización celular de E6*I en la condición donde se obtuvo mayor sobre-expresión, siendo esta la construcción en el vector pGPG. Se realizó un protocolo de extracción de proteínas periplasmáticas con sacarosa. Este proceso consiste en resuspeder el *pellet* bacteriano en 20.0% sacarosa en *buffer* Tris-HCl pH 8.0 y posteriormente agregar 1.0mM EDTA. La muestra se incuba 10 minutos y se centrifuga a 4℃ durante 10 minutos a 10.000 rpm. El *pellet* se resuspende en 5.0mM $MgSO_4$ y se incuba durante 10 minutos en frío. Nuevamente se centrifuga la muestra, y el sobrenadante corresponde a las proteínas de periplasma. Luego, el pellet de la centrifugación se resuspende en *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 10.0mM 2-βM, se sonica y por último se centrifuga para separar la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble (*pellet*). .El análisis de las fracciones obtenidas mediante geles SDS-PAGE mostró que todas las proteínas de fusión se encuentran en la fracción insoluble de la bacteria, conocida como cuerpos de inclusión.

Luego de optimizar las condiciones de inducción de las proteínas de interés, se expresaron a escala las distintas construcciones de E6*I en el vector pGPG: se partió de un clon congelado a – 80℃ en una base de cepas a partir del cual se largó un inoculo de 2.0ml en medio LB con 100μg/ml de ampicilina, se creció durante 8 horas a 37℃ con agitación y se transfirieron 500μl a un pre-cultivo de 50.0ml de medio LB suplementado con 100μg/ml de ampicilina que se dejaron creciendo toda la noche a 37℃. A la mañana siguiente se agregó el pre-cultivo a 1.0L de medio mínimo y ampicilina, se creció a hasta

alcanzar una DO de 0.6 donde se indujo con 0.2mM fosfato y se dejó durante 18hs con agitación a 37℃ hasta el momento de la cosecha.

Purificación: Las células fueron cosechadas 18 horas pasada la inducción, congeladas a –80℃ para favorecer la ruptura de la pared celular y resuspendidas en *buffer* de lisis (BL: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 2.0mM EDTA, 2.0mM PMSF, 10.0mM 2-βM). Posteriormente las bacterias se sonicaron a alta potencia y se centrifugaron a 18.000 rpm para separar la fracción soluble de la insoluble, donde se encuentra la proteína CI2-E6*I. Los cuerpos de inclusión fueron extensivamente lavados en 3.0M urea y resuspendidos en 6.0M Gdm.Cl, 50mM Tris-HCl pH 7.5 y 10.0mM DTT. La muestra fue purificada utilizando una columna de fase reversa (C8) en HPLC utilizando un gradiente de acetonitrilo/H_2O/0.1% TFA. Posteriormente se liofilizaron las fracciones que contienen a la proteína de interés y se resuspendieron en 6.0M Gdm.Cl, 8.0mM HCl para evitar oxidaciones de las cisteínas presentes en la secuencia de E6*I. A partir de esta muestra se realizaron varios experimentos asociados a oxidaciones; esto fue posible porque la proteína CI2 a la que E6*I se encuentra fusionada no contiene cisteínas en su secuencia primaria.

Finalmente, se evaluó el grado de pureza de las proteínas purificadas mediante geles SDS-PAGE al 15%. Este protocolo fue el utilizado para las cuatro construcciones de E6*I expresadas durante la tesis.

Estabilización de estructura con Trifluoroetanol (TFE).

Para evaluar el efecto del TFE sobre la estructura secundaria de E6*I_{29-53}, E6*Ic11, E6*Ic31 y E6*Ic18, se titularon aproximadamente 20.0μM de péptido en *buffer* 20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.6M Gdm.Cl, 2.0mM TCEP con concentraciones crecientes de TFE en un rango de 0 a 55.0% v/v del alcohol. Se incubó 2 minutos entre cada punto y se midió el correspondiente espectro de DC. Las muestras con Zn contienen en el *buffer* 30.0μM $ZnSO_4$.

El % de hélice-α en TFE, indicado en las diferentes tablas del Capítulo II, se estimó a partir de la ecuación empírica (*173*):

$$\%_{\text{hélice}} = \text{mdeg}_{222\ \text{nm}} * 100 / -39500 * (1 - (2.57 * n)) \quad (4)$$

donde n es el número de residuos.

La curva de E6*I_{29-53} con Zn se ajustó a un modelo de dos estados Coil ↔ hélice-α. Se consideró que la energía libre de formación de hélice alfa depende en forma lineal del cociente [TFE]/[H_2O].

$$\Delta G_{Coil \leftrightarrow \text{hélice-}\alpha}([TFE]/[H_2O]) = \Delta G^{0\%\ TFE} - m_{TFE} * [TFE]/[H_2O] \quad (5)$$

Se ajustó la señal de elipticidad a 222 nm a la siguiente ecuación para obtener los valores de ΔG y *m* para la transición:

$$[\Theta]=[\Theta^{TFE}]+[\Theta^{H2O}] * e^{(1/RT(m[TFE]/[H2O]-\Delta G_{H2O}))} / (1+e^{(1/RT(m[TFE]/[H2O]-\Delta G_{H2O}))}) \quad (6)$$

donde $[\Theta^{H2O}]$ y $[\Theta^{TFE}]$ son las elipticidades medias por residuo en agua y alto TFE, R es la constante de los gases y T la temperatura en grados Kelvin. El ajuste de los datos fue realizado utilizando el programa Profit (Quantumsoft, Aurich, Switzerland).

Estabilización de estructura con Sodio Dodecil Sulfato (SDS).

Luego de replegar por dilución aproximadamente 40.0μM de péptido durante 1hora a temperatura ambiente, los cuatro péptidos evaluados se dializaron para quitar el Gdm.Cl residual que precipita en presencia de SDS. El *buffer* de diálisis utilizado fue 20mM Tris-HCl pH 7.5, 2.0mM DTT; para las muestras con metal se agregó en el *buffer* 15.0μM Zn. Luego de 16hs de diálisis, se tomó un espectro de DC, y se agregó 1.0mM (concentración sub-micelar) y 10.0mM (concentración micelar) SDS a cada una de las especies. Después de 3hs de incubación, se midieron los diferentes espectros de DC. La concentración de las muestras previo a agregar SDS, se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford. Estos valores fueron los utilizados para convertir los datos crudos en elipticidad molar.

En los casos donde las características del espectro indicaban la estabilización de estructura tipo hélice-alfa, se calculó el porcentaje de residuos en hélice considerando el valor de elipticidad molar a 222 nm y aplicando la ecuación (4) previamente descripta. Esto se realizó para poder comparar de manera más clara los resultados observados cualitativamente.

Cromatografía Líquida de Alta presión en Fase Reversa (RP-HPLC).

Todas las corridas de RP-HPLC se realizaron en una columna analítica de fase reversa C18 (Thermo Scientific) utilizando un gradiente lineal de 0-100% acetonitrilo/H_2O/0.1% ácido trifluoroacético (TFA) en 60 minutos. Los péptidos eluidos se detectaron a 220 nm.

E6*I completamente reducida se obtuvo diluyendo 10 veces la solución madre reducida en Gdm.Cl (ver arriba, preparación de la muestra) en *buffer* 50mM Tris-HCl pH 7.5 y 5.0mM TCEP. Para obtener E6*I completamente oxidada, se realizó el mismo

procedimiento pero en ausencia de TCEP e incubando la muestra a temperatura ambiente durante 24 hs. Generalmente, se inyectaron 15.0μg de péptido. Los experimentos se realizaron en una concentración residual de 0.6M Gdm.Cl para evitar la agregación instantánea del péptido luego de diluir la solución madre.

Los experimentos de oxidación en función del tiempo se realizaron diluyendo alícuotas de la solución madre reducida en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 solo, con 5.0mM TCEP o 50.0μM zinc, según se indica. Estas condiciones se midieron en 0.6M y en 6.0M Gdm.Cl para evaluar contribuciones conformacionales en el comportamiento observado. A cada tiempo seleccionado, la reacción de oxidación se frena con el agregado de 0.1% TFA y se analiza por RP-HPLC como se describió anteriormente. Se utilizó el programa del equipo de HPLC para integrar las áreas bajo la curva de las especies oxidada o reducida.

Finalmente, para poder comparar las diferentes cinéticas obtenidas se estimó el tiempo medio (t½) t½ de oxidación de las distintas especies evaluadas. Mediante el programa KaleidaGraph se ajustaron los datos a una ecuación exponencial (7) y a partir del valor λ se obtuvo el tiempo medio (8):

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t} S \quad (7)$$

$$t½ = 1/\lambda * \ln 2 \quad (8)$$

Análisis de la reacción de oxidación por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Todas las mediciones de espectrometría de masas se realizaron en un equipo Bruker Microflex (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Se mezclaron volúmenes iguales de la muestra de interés (aproximadamente 10.0μM) y de la matriz *α–cyano hydroxy cinnamic acid* (HCCA) disuelta en 70% acetonitrilo (v/v), 0.1% TFA (v/v) y se analizaron alícuotas de 1.0μl por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los tratamientos con iodoacetamida (IAA) se realizaron incubando E6*I reducido u oxidado con 56.0mM IAA en 50mM *buffer* carbonato de amonio pH 7.8 durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente todas las muestras se precipitaron con TCA para eliminar el exceso de IAA antes del análisis por MALDI y se resuspendieron en una solución de acetonitrilo/TFA 100/0.1%. Estas muestras se analizaron en modo lineal positivo.

La digestión del péptido se realizó agregando Endoproteinasa GluC (Sigma) en una relación enzima/péptido de 1:25m/m e incubando a 25℃ durante 2 horas. Los péptidos obtenidos luego de la digestión se pasaron por un Zip-TipC18 (Millipore Corp,

Billerica, MA) para desalarlos y se eluyeron con acetonitrilo/TFA 50/0.1%. Se seleccionaron y analizaron los fragmentos en el rango de masas de 1000-4000 Da, utilizando el modo reflectron positivo que incrementa considerablemente la resolución de los picos.

*Determinación del potencial redox de E6*I.*

La constante de equilibrio redox (K_{eq}) para la oxidación de las cisteínas de E6*I se obtuvo incubando el péptido con el par redox de referencia DTT_{red}/ DTT_{Ox}. Brevemente, se incubaron 15.0μg de E6*I reducida durante 3 horas a 25℃ en 50mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 10.0mM del par redox. El potencial redox se reguló variando el DTT_{red} desde 0.01mM hasta 9.76mM y el DTT_{Ox} desde 0.24mM hasta 9.99mM mientras se mantuvo fija la concentración final de DTT en 10.0mM. El experimento se realizó en 6.0M Gdm.Cl. Después de 3 horas, se agregó 0.1% TFA a cada muestra y se las analizó por RP-HPLC. La fracción de E6*I en su forma reducida se calculó integrando el área bajo la curva del pico de HPLC. Los datos se evaluaron de acuerdo a la ecuación (9):

$$R = ([DTT_{red}] / [DTT_{Ox}]) / (K_{eq} + [DTT_{red}] / [DTT_{Ox}]) \quad (9)$$

donde R es la fracción de péptido reducido en el equilibrio, y K_{eq} es la constante de equilibrio. El potencial redox estándar (E_0') de E6*I se cálculo utilizando la ecuación de Nernst (10):

$$E_0'_{\text{proteína}} = E_0'_{\text{referencia}} - (RT/2F) \ln K_{eq} \quad (10)$$

considerando el valor de -0.307 V para el potencial redox del par DTT_{red}/ DTT_{Ox} (*174*).

Experimentos de unión a Zn.

Cuantificación del Zn unido a E6*I: La concentración de péptido a utilizar en los ensayos de cuantificación del metal unido, fue determinado por el ensayo colorimétrico de Bradford y por absorción de tirosinatos a pH básico (ver arriba, preparación de la muestra). El Zn unido a E6*I se determinó por la medición espectrofotométrica del indicador colorimétrico de metales (2-pyridylazo)resorcinol (PAR) (*155*). En resumen, se diluyó 10 veces la solución madre de E6*I reducido en un *buffer* conteniendo un agente reductor y 1.5 equivalentes de Zn, se incubó 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se trató con Chellex 100 (Biorad) para remover el metal débilmente unido y se purificó en columna PD-10 (GE Healthcare). Se incubaron 6.0μM de la muestra con 100.0μM de PAR y 100.0μM of *p-hydroxymercuriphenylsulfonate* (PMPS) en 50mM *buffer* fosfato de sodio pH 7.0 y

0.2M Gdm.Cl. La reacción se midió a 500 nm y la cantidad de Zn unido se cuantificó comparando con una curva estándar (Sigma) en ausencia y presencia de PMPS. El valor obtenido en presencia de PMPS representa el Zn total de la muestra mientras que el extraído con el PAR se considera el Zn unido débilmente; la diferencia entre estos dos valores proporciona la cantidad de Zn que se encuentra fuertemente unido a E6*I. Se obtuvo el mismo resultado midiendo en 50mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5 y 0.2M Gdm.Cl.

Ensayo de competencia: Inicialmente se agregó E6*I reducido y desnaturalizado para obtener una concentración final de 6.0µM en una solución conteniendo 6.0µM Zn y 100.0µM PAR en 50mM *buffer* fosfato de sodio pH 7.0, 2.0mM TCEP y 0.6M Gdm.Cl. Se monitoreó la absorbancia a 500 nm, indicativa de la formación del complejo Zn $(PAR)_2$, en función del tiempo luego del agregado de E6*I. Cuando se indica en el experimento, se agregaron PMPS y DTT a una concentración final de 160.0µM y 250.0µM respectivamente. Este protocolo también se realizó con las proteínas recombinantes (CI2-E6*I wt, C23S y SinC). En todos los casos, se obtuvo el mismo resultado midiendo en *buffer* Tris-HCl pH 7.5 en lugar de fosfato de sodio pH 7.0.

Titulaciones en presencia de PAR: En las titulaciones con Zn se utilizó como indicador colorimétrico el reactivo PAR que, como se mencionó anteriormente, absorbe fuertemente a 500 nm cuando se une al metal. Las mediciones se realizaron en 50mM *buffer* Tris-HCl pH 7.5, 2.0mM TCEP y 0.6M Gdm.Cl.

Modelo A: se agregaron cantidades crecientes de una solución madre concentrada de $ZnSO_4$ a una solución con 100.0µM PAR y 6.0µM E6*I (también se utilizó E6*I_{29-53} a la misma concentración en este ensayo) y se midió la absorbancia a 500 nm una vez alcanzado el equilibrio de la reacción. La estequiometría de la unión se calculó gráficamente considerando el punto de inflexión de la curva obtenida.

Modelo B: consistió en agregar cantidades crecientes de una solución madre concentrada, reducida y desnaturalizada de E6*I (también utilizamos E6*I_{29-53} y EDTA) a una solución con 100.0µM PAR y 3.0µM Zn y evaluar la absorbancia a 500 nm. En este caso, a diferencia del otro modelo de titulación, se observa un descenso en la absorbancia a 500 nm correspondiente al desplazamiento del metal unido al PAR por la molécula utilizada como competidor. La cantidad de Zn desplazado dependerá de las afinidades relativas del PAR y el competidor.

Finalmente, estos experimentos también se realizaron en 6.0M Gdm.Cl para evaluar contribuciones conformacionales en las afinidades observadas por el Zn.

Titulaciones con Zn evaluando la estructura secundaria por DC: Las titulaciones con Zn

evaluando el cambio en la estructura secundaria se realizaron con 20µM del péptido E6*I_{29-53} en *buffer* 20mM Tris-HCl pH 7.5, 2.0mM TCEP y 0.6M Gdm.Cl. Se agregaron concentraciones crecientes de Zn a partir de una solución madre de $ZnSO_4$ y se midieron los correspondientes espectros de DC. La estequiometría de la unión se calculó gráficamente considerando el punto de inflexión de la curva obtenida.

Titulaciones con Zn evaluando emisión de fluorescencia de tirosinas: Las titulaciones con Zn evaluando el cambio en la emisión de fluorescencia de tirosinas se realizaron con 6µM del péptido E6*I_{29-53} en *buffer* 20mM Tris-HCl pH 7.5, 2.0mM TCEP y 0.6M Gdm.Cl. Los espectros fueron registrados utilizando un fluorímetro Aminco-Bowman Series 2 (Spectronic Co. Rochester, NY, EEUU). La temperatura se mantuvo constante en 20.0+0.1℃ utilizando un baño termostático, y por cada muestra se promediaron tres espectros utilizando una longitud de onda de excitación de 276 nm y tomando espectros de emisión en el rango 290-400 nm a una velocidad de barrido de 1.0nm/seg utilizando apertura de excitación y emisión de 4 nm. Nuevamente, la estequiometría de la unión se calculó gráficamente considerando el punto de inflexión de la curva obtenida.

Obtención de E6-HPV16 para producción de anticuerpos monoclonales.

El protocolo de purificación de E6 HPV16 expresada como proteína de fusión a un *tag* de histidinas fue desarrollado previamente en el laboratorio (*75*) y se detalla a continuación: la construcción pet15b-E6HPV16 se expresa en bacterias de la cepa BL21(DE3) de *E. coli.* Las células se crecieron en medio LB, 100µg/ml de ampicilina a 37ºC y fueron inducidas con 0.4mM IPTG a una DO de 0.6. A las dos horas de la inducción se agregó Rifampicina, 150µg/ml. Las células fueron cosechadas 18 horas pasada la inducción por centrifugación, congeladas a –80℃ y resuspendidas en *buffer* de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10.0mM 2-βM). Posteriormente se sonicaron y centrifugaron a 18.000 rpm para separar la fracción soluble de la insoluble. Los cuerpos de inclusión fueron extensivamente lavados en 4.0M urea y resuspendidos en 6.0M Gdm.Cl. La muestra fue purificada utilizando una columna de afinidad que quela Ni^{2+} (*Chelating Sepharose Fast Flow Column, Amersham Biosciences*) en *buffer* 20mM Tris HCl pH 7.5, 6.0M Urea. La elusión de la proteína se realiza aplicando un gradiente de 0 a 0.5M Imidazol. El proceso de replegado se realiza dializando contra *buffer* C (20mM acetato de sodio pH 5.0, 1.0mM DTT, 5.0*µ*M $ZnSO_4$) a 4 ºC. La proteína se concentra usando un dispositivo de filtrado AMICON (Millipore) y posteriormente se efectúa una cromatografía de tamiz molecular en una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) equilibrada en

buffer C. Luego de este protocolo de purificación, E6 se encuentra formando estructuras de alto peso molecular. La concentración de proteína fue cuantificada mediante dos métodos distintos, midiendo absorbancia a 280 nm y utilizando el método de Bradford, siendo ambos coincidentes dentro del error esperado.

ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay) indirecto.

Se inmovilizaron 0.25μg de proteína por pocillo en 50.0μl finales de TBS 1X (excepto para la proteína E6 que se inmovilizó en *buffer* 10mM acetato de sodio pH 5.0 dado que agrega en el pH del TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) en cámara húmeda. Se bloqueó con 200.0μl finales de 1.0% BSA en TBS 1X (solución de bloqueo) durante 2 horas a TA.

La incubación con el anticuerpo primario se realizó en solución de bloqueo durante 1 hora a TA. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (*goat anti-rabbit* HRP 1:1000, DAKO) durante 1 hora a TA. El revelado se realizó con 50.0μl de una solución 1.0ml *buffer* OPD + 2.0mg OPD (o-Phenylenediamine) + 1.0μl H_2O_2. La reacción se produce en oscuridad, 5-8 min en cámara húmeda. Se detiene con H_2SO_4 4.0N, 50.0μl. Por último se lee la DO a 490nm.

Western Blot.

Aproximadamente 0.2μg de proteína recombinante (E6 y CI2-E6*I) se corrieron en un gel SDS-PAGE, transfirió a una membrana de nitrocelulosa con sistema sem-seco, durante 1h a 140mA. La membrana se bloqueó con 3% BSA en TBS-Tween 0.1% durante 1 hora a RT (solución de bloqueo). Se lavó con TBS-Tw.

La incubación con el anticuerpo se realizó en solución de bloqueo durante 1 hora a TA (dil 1:1000). Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (*goat anti-rabbit* HRP 1:1000, DAKO) durante 1 hora a TA. El revelado se realizó con el reactivo α-cloro naftol.

*Marcación de E6*I con FITC.*

E6*I y E6*I_{29-53} fueron derivatizados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) mediante el siguiente protocolo: 1.0-2.0mg de cada péptido fue incubado en una solución 1.5mg/ml de FITC en *buffer* bicarbonato de sodio pH 8.0, 6.0M Gdm.Cl por dos horas a temperatura ambiente. El péptido marcado fue separado del reactivo de marcación utilizando una columna de desalado (PD-10, GE Healthcare) y posteriormente

se concentró utilizando un dispositivo Amicon (Milipore). Se evaluó cualitativamente el nivel de marcación mediante geles de poliacrilamida analizando la cantidad de péptido por tinción con *coomasie blue* y el nivel de fluoresceína unida a los péptidos por visualización del gel con luz ultravioleta.

Este grado de pureza y nivel de marcación fue suficiente para realizar los ensayos de interacción por *far western*.

Far Western.

Como se describió previamente, este experimento consiste en la identificación de interacción entre diferentes proteínas utilizando los principios de la técnica de *western blot*. En este caso el anticuerpo primario es la proteína con la que se buscan blancos de interacción. Es posible utilizar un anticuerpo primario que identifique a la proteína E6*I y un secundario que amplifican la señal, o simplemente marcar la proteína E6*I con alguna sonda que permita la identificación directa.

Gel y transferencia: Se corre un gel SDS-PAGE 15% o 18% con aproximadamente 10.0μg de las diferentes proteínas con las que se quiere evaluar interacción. Una vez finalizada la corrida, el gel se transfiere a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema semi-seco de transferencia (Amershan) durante 1 hora a 140.0mA. El *buffer* de transferencia es Tris-Glicina, 20% v/v Metanol.

Luego de transferir las proteínas, la membrana se tiñe con el colorante *Rojo Ponceau* y se toma una foto para identificar las diferentes proteínas presentes en la membrana.

Bloqueo y lavados: Las membranas se bloquearon con una solución BSA 3.0% p/v en TBS 1x, 20.0mM 2-βM, 15.0μM Zn. En los casos donde se evalúa la unión del péptido en ausencia de metal, la solución de bloqueo contiene 2.0mM EDTA en lugar de Zn. El bloqueo se realiza durante 1h a temperatura ambiente con agitación.

Los lavados, de 10 minutos cada uno, se realizaron con TBS1x, 5.0mM 2-βM. Se prestó especial atención a la presencia de reductor en las soluciones porque E6 tiene muchas cisteínas en su secuencia y una alta tendencia a la oxidación, que puede afectar los resultados a obtener.

Incubación con péptido fluoresceinado y revelado: Se repliegan entre 15.0 y 25.0μl de las soluciones de E6*I-FITC y E6*I_{29-53}-FITC en 6.0M Gdm.Cl en la solución B: 0.25% p/v BSA en TBS 1x, 0.01% Tween, 0.03M Gdm.Cl, 5.0mM 2-βM durante 30 minutos previo a incubar con la membrana. Se realiza a temperatura ambiente en oscuridad. Luego de los

30 minutos de incubación, esta solución con péptido fluoresceinado se agrega a la membrana y se incuba durante 1h 30 minutos.

Se realizan 3 lavados con TBS1x y se revela en *Storm.* Las imágenes se procesan con el programa Image Quant.

REFERENCIAS

1. zur Hausen, H. (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers, *Biochim Biophys Acta 1288*, F55-78.
2. Strauss, M. J., Bunting, H., and Melnick, J. L. (1950) Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas, *J Invest Dermatol 15*, 433-444.
3. zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., and Bornkamm, G. W. (1974) Attempts to detect virus-secific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus, *Int J Cancer 13*, 650-656.
4. zur Hausen, J., Schulte-Holthausen, H., Wolf, H., Dorries, K., and Egger, H. (1974) Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses, *Int J Cancer 13*, 657-664.
5. de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., and zur Hausen, H. (2004) Classification of papillomaviruses, *Virology 324*, 17-27.
6. Doorbar, J. C. S. a. J. (2001) The biology of human papillomaviruses, in *Human Papillomaviruses. Clinical and scientific advances.* (Tyring, J. C. S. a. S. K., Ed.) First ed., p 12, Arnold, London.
7. Howley, P. M., and Lowy, D. R. (2001) Papillomaviridae, in *Fields Virology* (Knipe, D. M., and Howley, P. M., Eds.), pp 2197-2231, Lippincott, williams & Wilkins, Philadelphia.
8. Xavier F. Bosch, S. d. S., Xavier Castellsagué, Victor Moreno and Nubia Muñoz. (2006) Epidemiology of Human Papillomavirus Infections and associations with Cervical Cancer: New Opportunities for Prevention., in *Papillomavirus Research* (Saveria Campo, M., Ed.) First ed., pp 20-39, Caister Academic Press, Whymondham, Norfolk.
9. Cuzick, J., Szarewski, A., Terry, G., Ho, L., Hanby, A., Maddox, P., Anderson, M., Kocjan, G., Steele, S. T., and Guillebaud, J. (1995) Human papillomavirus testing in primary cervical screening, *Lancet 345*, 1533-1536.
10. Woodman, C. B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., Yates, M., Rollason, T. P., and Young, L. S. (2001) Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study, *Lancet 357*, 1831-1836.
11. M., S. C. (2005) The Essential Transforming Proteins of HPV: E5,E6 and E7., in *HPV Today Publications*, pp 8-10.
12. Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., and Bultmann, B. (2004) Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR, *J Clin Microbiol 42*, 3176-3184.
13. Zhou, J., Sun, X. Y., Stenzel, D. J., and Frazer, I. H. (1991) Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles, *Virology 185*, 251-257.
14. Cohen, J. (2005) Public health. High hopes and dilemmas for a cervical cancer vaccine, *Science 308*, 618-621.
15. McNeil, C. (2006) Who invented the VLP cervical cancer vaccines?, *J Natl Cancer Inst 98*, 433.
16. Schiller, J. T., and Nardelli-Haefliger, D. (2006) Chapter 17: Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer, *Vaccine 24 Suppl 3*, S147-153.
17. WHO, S. X. Castlellsague, T. Aguado, K.S. Louie, L. Bruni, J. Munoz, M. Diaz, K. Irwin, M. Gacic, O. Beauvais, G. Albero, E. Ferrer, S. Byrne, and Bosch, F. X. (2007) HPV and Cervical Cancer in the World, *World Health Organization: 1*, 241.
18. Barr, E., and Tamms, G. (2007) Quadrivalent human papillomavirus vaccine., *Clin Infecr Dis 45*, 607-609.
19. Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C. M., Moscicki, A. B., Romanowski, B., Roteli-Martins, C. M., Jenkins, D., Schuind, A., Costa Clemens, S. A., and Dubin, G. (2006) Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial, *Lancet 367*, 1247-1255.
20. Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K., and McMillan, N. A. (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses, *J Virol 71*, 2449-2456.
21. Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., and Sapp, M. (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate, *J Virol 75*, 1565-1570.

22. Doorbar, J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clin Sci (Lond) 110*, 525-541.
23. Howley, P. M. (1996) *Fields Virology*, third edition ed., Raven Publishers, Philadelphia.
24. Zheng, Z. M., and Baker, C. C. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation, *Front Biosci 11*, 2286-2302.
25. Zhao, K. N., Hengst, K., Liu, W. J., Liu, Y. H., Liu, X. S., McMillan, N. A., and Frazer, I. H. (2000) BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions, *Virology 272*, 382-393.
26. Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., and Huh, K. (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *Journal of virology 78*, 11451-11460.
27. Massimi, P., Shai, A., Lambert, P., and Banks, L. (2008) HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background, *Oncogene 27*, 1800-1804.
28. Harris, S. L., and Levine, A. J. (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops, *Oncogene 24*, 2899-2908.
29. Tommasino, M. (1997) Papillomaviruses in Human Cancer, in *Molecular Biology Intelligence Units* (Bioscience, L., Ed.), pp 71-102, Austin, Texas.
30. zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nature reviews 2*, 342-350.
31. Matlashewski, G., Banks, L., Wu-Liao, J., Spence, P., Pim, D., and Crawford, L. (1986) The expression of human papillomavirus type 18 E6 protein in bacteria and the production of anti-E6 antibodies, *J Gen Virol 67 (Pt 9)*, 1909-1916.
32. Sato, H., Furuno, A., and Yoshiike, K. (1989) Expression of human papillomavirus type 16 E7 gene induces DNA synthesis of rat 3Y1 cells, *Virology 168*, 195-199.
33. Munger, K. (2002) The role of human papillomaviruses in human cancers, *Front Biosci 7*, d641-649.
34. Munger, K., and Howley, P. M. (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions, *Virus Res 89*, 213-228.
35. Munger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., and Schlegel, R. (1989) The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes, *J Virol 63*, 4417-4421.
36. Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1989) HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes, *The EMBO journal 8*, 3905-3910.
37. Moody, C. A., and Laimins, L. A. (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nature reviews 10*, 550-560.
38. McLaughlin-Drubin, M. E., Bromberg-White, J. L., and Meyers, C. (2005) The role of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein during the complete viral life cycle, *Virology 338*, 61-68.
39. Wise-Draper, T. M., and Wells, S. I. (2008) Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets, *Front Biosci 13*, 1003-1017.
40. Pim, D., and Banks, L. (2010) Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses, *APMIS 118*, 471-493.
41. Garcia-Alai, M. M., Alonso, L. G., and Prat Gay, G. d. (2007) The N-terminal module of HPV16 E7 is an intrinsically disordered domain that confers conformational and recognition plasticity to the oncoprotein, *Biochemistry 46*, 10405-10412.
42. Alonso, L. G., Garcia-Alai, M. M., Nadra, A. D., Lapena, A. N., Almeida, F. L., Gualfetti, P., and Prat-Gay, G. D. (2002) High-risk (HPV16) human papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners, *Biochemistry 41*, 10510-10518.
43. Liu, X., Clements, A., Zhao, K., and Marmorstein, R. (2006) Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor, *The Journal of biological chemistry 281*, 578-586.
44. Ohlenschlager, O., Seiboth, T., Zengerling, H., Briese, L., Marchanka, A., Ramachandran, R., Baum, M., Korbas, M., Meyer-Klaucke, W., Durst, M., and Gorlach, M. (2006) Solution

structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7, *Oncogene 25*, 5953-5959.

45. McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R., and Laimins, L. A. (1993) Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding, *J Virol 67*, 3142-3150.
46. McLaughlin-Drubin, M. E., and Munger, K. (2009) Oncogenic activities of human papillomaviruses, *Virus Res 143*, 195-208.
47. Alonso, L. G., Garcia-Alai, M. M., Smal, C., Centeno, J. M., Iacono, R., Castano, E., Gualfetti, P., and de Prat-Gay, G. (2004) The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers, *Biochemistry 43*, 3310-3317.
48. Clements, A., Johnston, K., Mazzarelli, J. M., Ricciardi, R. P., and Marmorstein, R. (2000) Oligomerization properties of the viral oncoproteins adenovirus E1A and human papillomavirus E7 and their complexes with the retinoblastoma protein, *Biochemistry 39*, 16033-16045.
49. Dantur, K., Alonso, L., Castano, E., Morelli, L., Centeno-Crowley, J. M., Vighi, S., and de Prat-Gay, G. (2009) Cytosolic accumulation of HPV16 E7 oligomers supports different transformation routes for the prototypic viral oncoprotein: the amyloid-cancer connection, *Int J Cancer 125*, 1902-1911.
50. Alonso, L. G., Smal, C., Garcia-Alai, M. M., Chemes, L., Salame, M., and Prat Gay, G. d. (2006) Chaperone holdase activity of human papillomavirus E7 oncoprotein, *Biochemistry 45*, 657-667.
51. Tompa, P., and Csermely, P. (2004) The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones, *Faseb J 18*, 1169-1175.
52. Uversky, V. N., Roman, A., Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2006) Protein intrinsic disorder and human papillomaviruses: increased amount of disorder in E6 and E7 oncoproteins from high risk HPVs, *J Proteome Res 5*, 1829-1842.
53. Tompa, P., Fuxreiter, M., Oldfield, C. J., Simon, I., Dunker, A. K., and Uversky, V. N. (2009) Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins, *Bioessays 31*, 328-335.
54. Tokuriki, N., Oldfield, C. J., Uversky, V. N., Berezovsky, I. N., and Tawfik, D. S. (2009) Do viral proteins possess unique biophysical features?, *Trends Biochem Sci 34*, 53-59.
55. Shally, M., Alloul, N., Jackman, A., Muller, M., Gissmann, L., and Sherman, L. (1996) The E6 variant proteins E6I-E6IV of human papillomavirus 16: expression in cell free systems and bacteria and study of their interaction with p53, *Virus Res 42*, 81-96.
56. Ordonez, R. M., Espinosa, A. M., Sanchez-Gonzalez, D. J., Armendariz-Borunda, J., and Berumen, J. (2004) Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription, *J Gen Virol 85*, 1433-1444.
57. Barbosa, M. S., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1989) Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins, *J Virol 63*, 1404-1407.
58. Cole, S. T., and Danos, O. (1987) Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products, *J Mol Biol 193*, 599-608.
59. Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer Res 54*, 4855-4878.
60. Stewart, D., Ghosh, A., and Matlashewski, G. (2005) Involvement of nuclear export in human papillomavirus type 18 E6-mediated ubiquitination and degradation of p53, *J Virol 79*, 8773-8783.
61. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell 63*, 1129-1136.
62. Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, *Cell 75*, 495-505.

63. Butz, K., Shahabeddin, L., Geisen, C., Spitkovsky, D., Ullmann, A., and Hoppe-Seyler, F. (1995) Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells, *Oncogene 10*, 927-936.
64. Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T., and Cory, S. (1994) DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2, *Cell 79*, 329-339.
65. Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., and Galloway, D. A. (2009) Papillomavirus E6 proteins, *Virology 384*, 324-334.
66. Thomas, M., Massimi, P., Navarro, C., Borg, J. P., and Banks, L. (2005) The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins, *Oncogene 24*, 6222-6230.
67. Banks, L., Pim, D., and Thomas, M. (2003) Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction, *Trends Biochem Sci 28*, 452-459.
68. Masson, M., Hindelang, C., Sibler, A. P., Schwalbach, G., Trave, G., and Weiss, E. (2003) Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells, *J Gen Virol 84*, 2099-2104.
69. Daniels, P. R., Sanders, C. M., and Maitland, N. J. (1998) Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6-associated protein in insect and human cells, *Journal of General Virology 79*, 489-499.
70. Liang, X. H., Volkmann, M., Klein, R., Herman, B., and Lockett, S. J. (1993) Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical carcinoma cell lines, *Oncogene 8*, 2645-2652.
71. Kanda, T., Watanabe, S., Zanma, S., Sato, H., Furuno, A., and Yoshiike, K. (1991) Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif, *Virology 185*, 536-543.
72. Guccione, E., Massimi, P., Bernat, A., and Banks, L. (2002) Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins, *Virology 293*, 20-25.
73. Le Roux, L. G., and Moroianu, J. (2003) Nuclear entry of high-risk human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein occurs via several pathways, *J Virol 77*, 2330-2337.
74. Tao, M., Kruhlak, M., Xia, S., Androphy, E., and Zheng, Z. M. (2003) Signals that dictate nuclear localization of human papillomavirus type 16 oncoprotein E6 in living cells, *J Virol 77*, 13232-13247.
75. García-Alai María M., Karina I. Dantur, Clara Smal, Lía Pietrasanta, and Prat-Gay, a. G. d. (2007) High risk HPV E6 oncoproteins assemble into large oligomers that allow localization of endogenous species in prototypic HPV transformed cell lines, *Biochemistry 46*, 341-349.
76. Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J. F., Weiss, E., and Trave, G. (2001) Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein, *Protein Expr Purif 23*, 22-32.
77. Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J. F., Weiss, E., and Trave, G. (2001) A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins: application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein, *Protein Eng 14*, 297-305.
78. Degenkolbe, R., Gilligan, P., Gupta, S., and Bernard, H. U. (2003) Chelating agents stabilize the monomeric state of the zinc binding human papillomavirus 16 E6 oncoprotein, *Biochemistry 42*, 3868-3873.
79. Ristriani, T., Masson, M., Nomine, Y., Laurent, C., Lefevre, J. F., Weiss, E., and Trave, G. (2000) HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes four-way junctions, *J Mol Biol 296*, 1189-1203.
80. Nomine, Y., Masson, M., Charbonnier, S., Zanier, K., Ristriani, T., Deryckere, F., Sibler, A. P., Desplancq, D., Atkinson, R. A., Weiss, E., Orfanoudakis, G., Kieffer, B., and Trave, G. (2006) Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis, *Mol Cell 21*, 665-678.
81. Lipari F., McGibbon G. A, Wardrop E., and Cordingley, a. M. G. (2001) Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn-binding fragment from de human papillomavirus type 16 E6 protein., *Biochemistry 40*, 1196-1204.

82. Liu, Y., Cherry, J. J., Dineen, J. V., Androphy, E. J., and Baleja, J. D. (2009) Determinants of stability for the E6 protein of papillomavirus type 16, *J Mol Biol 386*, 1123-1137.
83. Nomine, Y., Charbonnier S., Miguet L., Potier N., Van Dorsselaer A., Atkinson R. A., Trave G., and B., a. K. (2005) 1H and 15N resonance assignment, secondary structure and dynamic behaviour of the C-terminal domain of human papillomavirus oncoprotein E6., *Journal of biomolecular NMR 31*, 129-141.
84. Zanier, K., Ruhlmann, C., Melin, F., Masson, M., Ould M'hamed Ould Sidi, A., Bernard, X., Fischer, B., Brino, L., Ristriani, T., Rybin, V., Baltzinger, M., Vande Pol, S., Hellwig, P., Schultz, P., and Trave, G. (2010) E6 proteins from diverse papillomaviruses self-associate both in vitro and in vivo, *J Mol Biol 396*, 90-104.
85. Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U., and Iftner, T. (1996) Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA, *J Virol 70*, 2339-2349.
86. Schwartz, S. (2008) HPV-16 RNA processing, *Front Biosci 13*, 5880-5891.
87. Jia, R., Liu, X., Tao, M., Kruhlak, M., Guo, M., Meyers, C., Baker, C. C., and Zheng, Z. M. (2009) Control of the papillomavirus early-to-late switch by differentially expressed SRp20, *J Virol 83*, 167-180.
88. Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M., and Crawford, L. (1990) Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line, *Virology 178*, 254-262.
89. Milligan, S. G., Veerapraditsin, T., Ahamet, B., Mole, S., and Graham, S. V. (2007) Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells, *Virology 360*, 172-181.
90. Ozbun, M. A., and Meyers, C. (1997) Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b, *J Virol 71*, 5161-5172.
91. Schneider-Gadicke, A., and Schwarz, E. (1986) Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes, *The EMBO journal 5*, 2285-2292.
92. Smotkin, D., and Wettstein, F. O. (1986) Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83*, 4680-4684.
93. Schneider-Gadicke, A., Kaul, S., Schwarz, E., Gausepohl, H., Frank, R., and Bastert, G. (1988) Identification of the human papillomavirus type 18 E6 and E6 proteins in nuclear protein fractions from human cervical carcinoma cells grown in the nude mouse or in vitro, *Cancer Res 48*, 2969-2974.
94. Filippova, M., Johnson, M. M., Bautista, M., Filippov, V., Fodor, N., Tungteakkhun, S. S., Williams, K., and Duerksen-Hughes, P. J. (2007) The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity, *J Virol 81*, 4116-4129.
95. Tang, S., Tao, M., McCoy, J. P., Jr., and Zheng, Z. M. (2006) The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation, *J Virol 80*, 4249-4263.
96. Pim, D., Massimi, P., and Banks, L. (1997) Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth, *Oncogene 15*, 257-264.
97. Pim, D., and Banks, L. (1999) HPV-18 E6*I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6, *Oncogene 18*, 7403-7408.
98. Guccione, E., Pim, D., and Banks, L. (2004) HPV-18 E6*I modulates HPV-18 full-length E6 functions in a cell cycle dependent manner, *Int J Cancer 110*, 928-933.
99. Mantovani, F., and Banks, L. (1999) Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines, *Oncogene 18*, 3309-3315.
100. Filippova, M., Song, H., Connolly, J. L., Dermody, T. S., and Duerksen-Hughes, P. J. (2002) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and

protects cells from TNF-induced apoptosis, *The Journal of biological chemistry 277*, 21730-21739.

101. Filippova, M., Parkhurst, L., and Duerksen-Hughes, P. J. (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis, *The Journal of biological chemistry 279*, 25729-25744.
102. Benedict, C. A. (2003) Viruses and the TNF-related cytokines, an evolving battle, *Cytokine Growth Factor Rev 14*, 349-357.
103. Filippova, M., Filippov, V. A., Kagoda, M., Garnett, T., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, P. J. (2009) Complexes of human papillomavirus type 16 E6 proteins form pseudo-death-inducing signaling complex structures during tumor necrosis factor-mediated apoptosis, *J Virol 83*, 210-227.
104. Pim, D., Tomaic, V., and Banks, L. (2009) The human papillomavirus (HPV) E6* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein, *J Virol 83*, 9863-9874.
105. Vaeteewoottacharn, K., Chamutpong, S., Ponglikitmongkol, M., and Angeletti, P. C. (2005) Differential localization of HPV16 E6 splice products with E6-associated protein, *Virology journal 2*, 50.
106. Del Moral-Hernandez, O., Lopez-Urrutia, E., Bonilla-Moreno, R., Martinez-Salazar, M., Arechaga-Ocampo, E., Berumen, J., and Villegas-Sepulveda, N. (2011) The HPV-16 E7 oncoprotein is expressed mainly from the unspliced E6/E7 transcript in cervical carcinoma C33-A cells, *Archives of virology*.
107. Van Doorslaer, K., Sidi, A. O., Zanier, K., Rybin, V., Deryckere, F., Rector, A., Burk, R. D., Lienau, E. K., van Ranst, M., and Trave, G. (2009) Identification of unusual E6 and E7 proteins within avian papillomaviruses: cellular localization, biophysical characterization, and phylogenetic analysis, *J Virol 83*, 8759-8770.
108. Giri, I., Danos, O., and Yaniv, M. (1985) Genomic structure of the cottontail rabbit (Shope) papillomavirus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82*, 1580-1584.
109. Lipari, F., McGibbon, G. A., Wardrop, E., and Cordingley, M. G. (2001) Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn2+-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein, *Biochemistry 40*, 1196-1204.
110. Nomine, Y., Charbonnier, S., Ristriani, T., Stier, G., Masson, M., Cavusoglu, N., Van Dorsselaer, A., Weiss, E., Kieffer, B., and Trave, G. (2003) Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 C-terminal DNA-binding domain, *Biochemistry 42*, 4909-4917.
111. Romero, P. R., Zaidi, S., Fang, Y. Y., Uversky, V. N., Radivojac, P., Oldfield, C. J., Cortese, M. S., Sickmeier, M., LeGall, T., Obradovic, Z., and Dunker, A. K. (2006) Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder enables increased functional diversity in multicellular organisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103*, 8390-8395.
112. Tungteakkhun, S. S., Filippova, M., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, P. J. (2010) The full-length isoform of human papillomavirus 16 E6 and its splice variant E6* bind to different sites on the procaspase 8 death effector domain, *J Virol 84*, 1453-1463.
113. Androphy, E. J., Hubbert, N. L., Schiller, J. T., and Lowy, D. R. (1987) Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines, *The EMBO journal 6*, 989-992.
114. Fasman, G. D. (1999) *Circular Dichroism And The Conformational Analysis of Biomolecules*, New York.
115. Westermark, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S., Masters, C. L., Merlini, G., Saraiva, M. J., and Sipe, J. D. (2002) Amyloid fibril protein nomenclature -- 2002, *Amyloid 9*, 197-200.
116. McIntosh PB, M. S., Jackson DJ, Khan J, Isaacson ER, Calder L, Raj K, Griffin HM, Wang Q, Laskey P, Eccleston JF and Doorbar J. (2008) Structural Analysis Reveals an Amyloid Form of the HPV 16 E1^E4

Protein and Provides a Molecular Basis for its Accumulation, *Journal of Virology 16*, 8196-8203.

117. Wetzler, D. E., Castano, E. M., and Prat Gay, G. d. (2007) A quasi-spontaneous amyloid route in a DNA binding gene regulatory domain: The papillomavirus HPV16 E2 protein, *Protein Sci 16*, 744-754.
118. Uversky, V. N. (2010) Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins, *Febs J 277*, 2940-2953.
119. Gast, K. A. M. (2005) Studying protein folding and aggregation by laser ligth scattering., in *Protein Folding Handbook* (Kiefhaber, J., Ed.) Wiley-VCH ed., pp 673-704.
120. LeVine, H., III (1999) Quantification of b-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T, *Methods Enzymol. 309*.
121. Prat Gay, G. d., Johnson, C. M., and Fersht, A. R. (1994) Contribution of a proline residue and a salt bridge to the stability of a type I reverse turn in chymotrypsin inhibitor-2, *Protein Eng 7*, 103-108.
122. Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96*, 3590-3594.
123. Chiti, F., Taddei, N., Bucciantini, M., White, P., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2000) Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein, *The EMBO journal 19*, 1441-1449.
124. Wright, C. F., Teichmann, S. A., Clarke, J., and Dobson, C. M. (2005) The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins, *Nature 438*, 878-881.
125. Dobson, C. M. (2005) An Overview of Protein Misfolding Diseases, in *Protein Folding Handbook* (Buchner, J., and Kiefhaber, T., Eds.), pp 1093-1113, Wiley-VCH Verlag GMBH & Co. KgaA, Weinheim.
126. Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded, *Biochim Biophys Acta 1698*, 131-153.
127. Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue, *PLoS Biol 4*, 100-107.
128. Grm, H. S., Massimi, P., Gammoh, N., and Banks, L. (2005) Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein, *Oncogene 24*, 5149-5164.
129. Birzele, F., Csaba, G., and Zimmer, R. (2008) Alternative splicing and protein structure evolution, *Nucleic Acids Res 36*, 550-558.
130. Heer, A., Alonso, L. G., and de Prat-Gay, G. (2011) E6*, the 50 amino acid product of the most abundant spliced transcript of the e6 oncoprotein in high-risk human papillomavirus, is a promiscuous folder and binder, *Biochemistry 50*, 1376-1383.
131. Munger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M., and Zacny, V. L. (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein, *Oncogene 20*, 7888-7898.
132. Lieutaud, P., Canard, B., and Longhi, S. (2008) MeDor: a metaserver for predicting protein disorder, *BMC Genomics 9 Suppl 2*, S25.
133. Munoz, V., and Serrano, L. (1994) Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters, *Nat Struct Biol 1*, 399-409.
134. Shi, Z., Olson, C. A., Rose, G. D., Baldwin, R. L., and Kallenbach, N. R. (2002) Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99*, 9190-9195.
135. Waterhous, D. V., and Johnson, W. C., Jr. (1994) Importance of environment in determining secondary structure in proteins, *Biochemistry 33*, 2121-2128.
136. de Prat-Gay, G. (1997) Conformational preferences of a peptide corresponding to the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus: implications for peptide-vaccine approaches, *Arch Biochem Biophys 341*, 360-369.
137. Sancho, J., Neira, J. L., and Fersht, A. R. (1992) An N-terminal fragment of barnase has residual helical structure similar to that in a refolding intermediate, *J Mol Biol 224*, 749-758.
138. Myers, J. K., Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci 4*, 2138-2148.

139. Chen, Y. H., Yang, J. T., and Chau, K. H. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry 13*, 3350-3359.
140. Wu, C. S., Ikeda, K., and Yang, J. T. (1981) Ordered conformation of polypeptides and proteins in acidic dodecyl sulfate solution, *Biochemistry 20*, 566-570.
141. Munoz, N. (2000) Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence, *J Clin Virol 19*, 1-5.
142. Schiffman, M., and Castle, P. E. (2003) Human papillomavirus: epidemiology and public health, *Arch Pathol Lab Med 127*, 930-934.
143. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins, *Curr Opin Struct Biol 12*, 54-60.
144. Garcia-Vallve, S., Alonso, A., and Bravo, I. G. (2005) Papillomaviruses: different genes have different histories, *Trends Microbiol 13*, 514-521.
145. de Souza, R. F., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2009) Diversity and evolution of chromatin proteins encoded by DNA viruses, *Biochim Biophys Acta 1799*, 302-318.
146. Linke, K., and Jakob, U. (2003) Not every disulfide lasts forever: disulfide bond formation as a redox switch, *Antioxid Redox Signal 5*, 425-434.
147. Giles, N. M., Watts, A. B., Giles, G. I., Fry, F. H., Littlechild, J. A., and Jacob, C. (2003) Metal and redox modulation of cysteine protein function, *Chem Biol 10*, 677-693.
148. Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P., and Bardwell, J. C. (1995) Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst?, *Cell 83*, 947-955.
149. Hoffmann, J. H., Linke, K., Graf, P. C., Lilie, H., and Jakob, U. (2004) Identification of a redox-regulated chaperone network, *The EMBO journal 23*, 160-168.
150. Marino, S. M., and Gladyshev, V. N. (2012) Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues, *The Journal of biological chemistry 287*, 4419-4425.
151. Dokmanic, I., Sikic, M., and Tomic, S. (2008) Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 64*, 257-263.
152. Kumsta, C., and Jakob, U. (2009) Redox-regulated chaperones, *Biochemistry 48*, 4666-4676.
153. Greenshields, A. L., Knickle, L. C., Syvitski, R., and Douglas, S. E. (2008) Strategies for recombinant expression of small, highly disulphide-bonded, cationic antimicrobial peptides, *Protein Pept Lett 15*, 985-994.
154. Gilbert, H. F. (1995) Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability, *Methods Enzymol. 251*, 8-28.
155. Hunt, J. B., Neece, S. H., and Ginsburg, A. (1985) The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from Escherichia coli aspartate transcarbamoylase, *Anal Biochem 146*, 150-157.
156. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K., and Somogyi, J. (1988) Zinc increases the affinity of phorbol ester receptor in T lymphocytes, *Biochem Biophys Res Commun 154*, 578-583.
157. Marino, S. M., and Gladyshev, V. N. (2010) Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces, *J Mol Biol 404*, 902-916.
158. Maret, W. (2004) Zinc and sulfur: a critical biological partnership, *Biochemistry 43*, 3301-3309.
159. Outten, C. E., and O'Halloran, T. V. (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis, *Science 292*, 2488-2492.
160. Tungteakkhun, S. S., Filippova, M., Neidigh, J. W., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, P. J. (2008) The interaction between human papillomavirus type 16 and FADD is mediated by a novel E6 binding domain, *J Virol 82*, 9600-9614.
161. Beerheide, W., Bernard, H. U., Tan, Y. J., Ganesan, A., Rice, W. G., and Ting, A. E. (1999) Potential drugs against cervical cancer: zinc-ejecting inhibitors of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein, *J Natl Cancer Inst 91*, 1211-1220.
162. Rice, W. G., Schaeffer, C. A., Harten, B., Villinger, F., South, T. L., Summers, M. F., Henderson, L. E., Bess, J. W., Jr., Arthur, L. O., McDougal, J. S., and et al. (1993) Inhibition of HIV-1 infectivity by zinc-ejecting aromatic C-nitroso compounds, *Nature 361*, 473-475.
163. Rice, W. G., Supko, J. G., Malspeis, L., Buckheit, R. W., Jr., Clanton, D., Bu, M., Graham, L., Schaeffer, C. A., Turpin, J. A., Domagala, J., Gogliotti, R., Bader, J. P., Halliday, S. M.,

Coren, L., Sowder, R. C., 2nd, Arthur, L. O., and Henderson, L. E. (1995) Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS, *Science 270*, 1194-1197.

164. Rice, W. G., Hillyer, C. D., Harten, B., Schaeffer, C. A., Dorminy, M., Lackey, D. A., 3rd, Kirsten, E., Mendeleyev, J., Buki, K. G., Hakam, A., and et al. (1992) Induction of endonuclease-mediated apoptosis in tumor cells by C-nitroso-substituted ligands of poly(ADP-ribose) polymerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89*, 7703-7707.
165. Rice, W. G., Turpin, J. A., Huang, M., Clanton, D., Buckheit, R. W., Jr., Covell, D. G., Wallqvist, A., McDonnell, N. B., DeGuzman, R. N., Summers, M. F., Zalkow, L., Bader, J. P., Haugwitz, R. D., and Sausville, E. A. (1997) Azodicarbonamide inhibits HIV-1 replication by targeting the nucleocapsid protein, *Nat Med 3*, 341-345.
166. Ullman, C. G., Haris, P. I., Galloway, D. A., Emery, V. C., and Perkins, S. J. (1996) Predicted alpha-helix/beta-sheet secondary structures for the zinc-binding motifs of human papillomavirus E7 and E6 proteins by consensus prediction averaging and spectroscopic studies of E7, *Biochem J 319 (Pt 1)*, 229-239.
167. Giovane, C., Trave, G., Briones, A., Lutz, Y., Wasylyk, B., and Weiss, E. (1999) Targetting of the N-terminal domain of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with monomeric ScFvs blocks the E6-mediated degradation of cellular p53, *J Mol Recognit 12*, 141-152.
168. Kohler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature 256*, 495-497.
169. Lagrange, M., Charbonnier, S., Orfanoudakis, G., Robinson, P., Zanier, K., Masson, M., Lutz, Y., Trave, G., Weiss, E., and Deryckere, F. (2005) Binding of human papillomavirus 16 E6 to p53 and E6AP is impaired by monoclonal antibodies directed against the second zinc-binding domain of E6, *J Gen Virol 86*, 1001-1007.
170. Garcia-Alai, M. M., Tidow, H., Natan, E., Townsley, F. M., Veprintsev, D. B., and Fersht, A. R. (2008) The novel p53 isoform "delta p53" is a misfolded protein and does not bind the p21 promoter site, *Protein Sci 17*, 1671-1678.
171. Schneider, T. D., and Stephens, R. M. (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences, *Nucleic Acids Res 18*, 6097-6100.
172. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature 227*, 680-685.
173. Prat Gay, G. d. (1997) Conformational preferences of a peptide corresponding to the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus: implications for peptide-vaccine approaches, *Arch Biochem Biophys 341*, 360-369.
174. Rozhkova, A., and Glockshuber, R. (2007) Kinetics of the intramolecular disulfide exchange between the periplasmic domains of DsbD, *J Mol Biol 367*, 1162-1170.